

Kleber Makoto Mise

**Parâmetros biológicos e métodos de diferenciação de espécies
e ínstares de Coleoptera de interesse forense**

Tese de doutorado apresentado para o Programa
de Pós-Graduação em Entomologia,
Departamento de Zoologia, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientador: Profa. Dra. Lúcia Massutti de Almeida
Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin
Co-Orientador: Dra. Adriana Lacerda Twerdochlib

CURITIBA

2011

“...As the curtain calls, and the cast recedes,
I am all that ever was and all that ever will be.
In wither and repose this frayed chapter
now does close, and fade into neon black.”

Trecho de Forever, da banda Nevermore

Agradecimentos

A Professora Lúcia Massutti de Almeida por sempre me ajudar, orientar e aturar. A senhora será sempre meu modelo de orientador, pois o respeito com que lida com todos a sua volta, faz com que da mesma forma, todos a respeitem.

Ao Prof. Paulo H. G. Zarbin, pela ajuda na análise dos dados e redação.

A Profa. Adriana L. Twerdochlib pela ajuda com a biologia molecular.

A Profa. Cibele S. Ribeiro-Costa por toda ajuda e orientações.

Aos Professores Doutores Carla L. Bicho, José Roberto Pujol-Luz e aos colegas Cecília Kosmann, Daniela C. Bená, Aldenira F. Oliveira, por enviarem os espécimes sem os quais esse trabalho não poderia ser realizado.

Ao Prof. Mauricio O. Moura por ajudar nas análises estatísticas.

Ao Rodrigo C. Corrêa por sempre apoiar e ser parceiro no desenvolvimento de vários projetos.

A Camila Martins e aos demais membros do Laboratório de Semioquímicos – UFPR por toda a ajuda e paciência para realizar as análises químicas.

A Paula A.F.B. Bassi (você está certa!) e ao David R. Luz por toda a ajuda nas análises moleculares.

Ao Departamento de Patologia pela concessão do uso do nanodrop.

Aos vários colegas tanto do Laboratório de Bioecologia e Sistemática de Coleoptera que auxiliaram inestimavelmente no desenvolvimento desse estudo.

Ao Daniel P. Moura, Sirlei R. Rothe e Bruna P. Macari pela ajuda na criação.

A Ana Karina Pastre, que mereceria uma página de agradecimentos só dela, simplesmente por tudo!

Aos meus amigos por todo apoio e compreensão quando eu os trocava pela “porca”.

A minha família por me apoiar sempre.

A CAPES pela bolsa de pesquisa.

A Fundação Araucária, pelo auxílio financeiro.

Ao departamento de Zoologia pela estrutura física para realização do experimento.

Sumário

Lista de Tabelas	V
Lista de Figuras	VI
Resumo	VIII
Abstract	IX
1. Introdução Geral	1
1.1. Silphidae	2
1.2. Cleridae	4
1.3. Dermestidae	5
Referências	7
Capítulo I - Biologia de <i>Oxelytrum discicolle</i> (Brullé, 1840), <i>Oxelytrum erythrurum</i> (Blanchard, 1840), <i>Necrobia rufipes</i> (DeGeer, 1775), <i>Necrobia ruficollis</i> (Fabricius, 1775) e <i>Dermestes maculatus</i> DeGeer, 1774	12
Resumo	13
Abstract	14
1. Introdução	15
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3. Metodologia	17
3.1. <i>Oxelytrum discicolle</i> e <i>O. erythrurum</i>	18
3.2. <i>Necrobia rufipes</i> e <i>N. ruficollis</i>	19
3.3. <i>Dermestes maculatus</i>	19
4. Resultados e Discussão	20
4.1. <i>Oxelytrum discicolle</i>	20
4.2. <i>Oxelytrum erythrurum</i>	24
4.3. Comparação entre as espécies de <i>Oxelytrum</i>	25
4.4. Comportamento de <i>Oxelytrum discicolle</i> e <i>O. erythrurum</i>	26
4.5. <i>Dermestes maculatus</i>	27
4.6. <i>Necrobia ruficollis</i>	34
4.7. <i>Necrobia rufipes</i>	35
4.8. Comparação entre as espécies de <i>Necrobia</i>	37
5. Considerações Finais	39
6. Referências	40
Capítulo II - Variação ontogenética e interespecífica em espécies de Coleoptera de interesse forense baseada em hidrocarbonetos cuticulares	44
Resumo	45
Abstract	46
1. Introdução	47
2. Objetivos	50
2.1. Objetivo Geral	50
2.2. Objetivos Específicos	51
3. Metodologia	51
4. Resultados e Discussão	53
4.1. Silphidae	53
4.2. Cleridae	61
4.3. <i>Dermestes maculatus</i>	62
5. Considerações Finais	63

6. Referências	65
Capítulo III - Análise do gene citocromo oxidase I na diferenciação de espécies de Coleoptera de interesse forense	68
Resumo	69
1. Introdução	71
2. Objetivos.....	74
2.1. Objetivo Geral:	74
2.2. Objetivos Específicos:.....	74
3. Material e Métodos	74
3.1. Extração do DNA de espécies de <i>Oxelytrum</i>	75
3.2. Extração de DNA dos adultos de <i>Dermestes maculatus</i> , <i>Necrobia rufipes</i> e <i>Necrobia ruficollis</i>	76
3.3. Amplificação e Sequenciamento	77
3.4. Alinhamento	78
3.5. Análise dos dados.....	78
4. Resultados e Discussão	79
4.1. Extração de DNA	79
4.2. Amplificação	79
4.3. Sequenciamento	79
4.4. Análise de agrupamentos	80
5. Considerações Finais	81
6. Referências	86
Anexos.....	89

Lista de Tabelas

Tabela I. Comparação das médias de cada estágio de <i>Oxelytrum discicolle</i> do presente estudo com o de Velásquez & Vilorio (2009), com as temperaturas de 15, 20 e 28 °C.	23
Tabela II. Estágios de desenvolvimento de <i>Oxelytrum discicolle</i> e <i>Oxelytrum erythrurum</i> , com os testes utilizados, F ou U, e a probabilidade de serem iguais. Valores significativos estão em negrito.	26
Tabela III. Duração média (em dias) com o desvio padrão dos estádios de <i>Dermestes maculatus</i> a 25°C, $\pm 70\%$ de umidade relativa e 12h de fotofase.....	28
Tabela IV. Resumo dos artigos científicos publicados sobre <i>Dermestes maculatus</i> , com temperatura, umidade relativa, bem como a duração média de ovos, larva e pupa encontradas. * média por íntar larval (7 mudas).....	29
Tabela V. Valores do teste de Mann-Whitney para comparações entre as fases de desenvolvimento de <i>Necrobia rufipes</i> e <i>Necrobia ruficollis</i>	38
Tabela VI. Quantidade de exemplares por íntar de cada espécie utilizados na análise dos hidrocarbonetos de cutícula. Entre parênteses o número de repetições realizadas..	52
Tabela VII. Frequência média de bases (TCAG) e de A+T da citocromo oxidase subunidade I (COI) das principais espécies de Coleoptera de interesse forense.....	82
Tabela VIII. Posição dos sítios polimórficos do gene citocromo oxidase subunidade I (COI), em cada espécie analisada. O “–” indica espécies com apenas uma sequência. As posições em negrito indicam sítios em que não foi possível estabelecer se há polimorfismo.	83
Tabela IX. Matriz da distância genética entre a região da citocromo oxidase subunidade I de cada exemplar utilizado.	84

Lista de Figuras

Fig. 1. Duração média (em dias) dos estádios de <i>Oxelytrum discicolle</i> , com média encontrada, erro padrão e valores atípicos (outliers) a 25°C e $\pm 70\%$ de umidade relativa.	22
Fig. 2. Duração média (em dias) dos estádios de <i>Oxelytrum erythrurum</i> , com média encontrada, erro padrão e valores atípicos (outliers) a 25°C e $\pm 70\%$ de umidade relativa.	25
Fig. 3. Comprimento médio (cm) de machos e fêmeas de <i>Dermestes maculatus</i> com o intervalo de confiança de 0,95.	31
Fig. 4. Largura média (cm) de machos e fêmeas de <i>Dermestes maculatus</i> com o intervalo de confiança de 0,95.	32
Fig. 5. Porcentagem relativa de indivíduos de <i>Dermestes maculatus</i> (machos e fêmeas) que empupam após cada ínstar.	33
Fig. 6. Média de duração total de desenvolvimento (em dias) de machos e fêmeas de <i>Dermestes maculatus</i> , com o erro padrão.	33
Fig. 7. Duração média em dias de cada estágio de <i>Necrobia ruficollis</i> , com o erro padrão a 25°C, $\pm 70\%$ de umidade relativa e 12h de fotoperíodo.	35
Fig. 8. Duração média em dias de cada estágio de <i>Necrobia ruficollis</i> , com o erro padrão a 25°C, $\pm 70\%$ de umidade relativa e 12h de fotoperíodo.	37
Fig. 9. Análises cromatográficas obtidas a partir dos ínstar larvais de <i>Oxelytrum discicolle</i> usando extração em hexano. Os números indicam os picos pertencentes aos hidrocarbonetos e o "X", contaminantes.	54
Fig. 10. Espectro de massa do composto com índice de kovats de 2525.	55
Fig. 11. Espectro de massa do composto com índice de kovats de 2721.	55
Fig. 12. Análises cromatográficas obtidas a partir do terceiro ínstar e pupa de <i>Oxelytrum discicolle</i> usando extração pela SPME.	56
Fig. 13. Análises cromatográficas obtidas a partir dos ínstar larvais de <i>Oxelytrum erythrurum</i> usando extração em hexano. Os números indicam os picos pertencentes aos hidrocarbonetos e o "X", contaminantes.	57
Fig. 14. Espectro de massa do composto com índice de kovats de 2635.	57
Fig. 15. Espectro de massa do composto com índice de kovats de 2688.	57
Fig. 16. Análise cromatográfica do 1º ínstar larval de <i>Oxelytrum discicolle</i> e <i>Oxelytrum erythrurum</i> com extração por hexano. Os números ilustram os picos pertencentes a hidrocarbonetos e o "X", contaminantes.	58
Fig. 17. Análise cromatográfica do 2º ínstar larval de <i>Oxelytrum discicolle</i> e <i>Oxelytrum erythrurum</i> com extração por hexano. Os números ilustram os picos pertencentes a hidrocarbonetos.	59
Fig. 18. Análise cromatográfica do 3º ínstar larval de <i>Oxelytrum discicolle</i> e <i>Oxelytrum erythrurum</i> com extração por hexano. Os números ilustram os picos pertencentes a hidrocarbonetos e o "X", contaminantes.	60
Fig. 19. Análise cromatográfica de <i>Necrobia rufipes</i> e <i>Necrobia ruficollis</i> , por extração em hexano.	61
Fig. 20. Análise cromatográfica de larvas do terceiro ínstar de <i>Necrobia rufipes</i> , por 5 minutos de extração com SPME.	62
Fig. 21. Análise cromatográfica das extrações em hexano de 30 larvas do primeiro ínstar de <i>Dermestes maculatus</i> .	63
Fig. 22. Análise de agrupamento gerada pelo método de <i>Neighbor-joining</i> . A árvore ilustrada se refere a árvore com soma de comprimento dos ramos de 0.60404282.	

Número de réplicas para o <i>bootstrap</i> 5000, sendo as distâncias evolutivas computadas pelo método de Kimura 2-parâmetros.	85
---	----

Resumo

A entomologia forense constitui um campo multidisciplinar de estudo dos insetos que interage com os procedimentos legais. Dentre as várias aplicações dessa ciência está a estimativa do intervalo pós-morte (IPM), normalmente baseada no tempo de desenvolvimento dos imaturos. Contudo para a correta estimativa do IPM é de extrema importância a identificação adequada da espécie, em função de variações no ciclo de vida de acordo com o organismo considerado. Dessa forma, os objetivos desse estudo foram avaliar os parâmetros biológicos, métodos de diferenciação de ínstaes e de espécies de Coleoptera de interesse forense. As espécies foram criadas a 25°C e $\pm 70\%$ de UR, e foi testada sua diferenciação por hidrocarbonetos cuticulares e pelo sequenciamento do gene citocromo oxidase I (COI) (DNAm). A duração dos ínstaes larvais variou entre espécies do mesmo gênero, enfatizando a importância de uma identificação espécie-específica. Além disso, esse estudo foi o primeiro a registrar a duração do ciclo de vida de *Oxelytrum erythrurum*. A diferenciação das espécies de *Oxelytrum* foi possível por meio dos hidrocarbonetos cuticulares, sendo que em *O. erythrurum* pôde-se distinguir os ínstaes larvais. Todas as espécies puderam ser diferenciadas pelo gene COI pelo método de Neighbor-Joining, sendo que a variação intraespecífica foi menor do que a interespecífica. A futura publicação das seqüências on-line (GenBank) possibilitará que, conforme forem sendo obtidas seqüências de espécimes de outras regiões, essa diferenciação fique ainda mais precisa. O presente estudo contribuiu para que essas espécies possam servir como evidência entomológica na solução de casos no âmbito legal e cível.

Abstract

Forensic entomology is any field of entomology that deals with legal procedures. One of its many uses is to estimate the *post-mortem* interval (PMI), usually based on the duration of immature development. However in order to achieve a precise PMI estimate, the correct species identification is of extreme importance, due to variations in the life cycle according to the studied organism. Therefore, the objectives of this thesis were to evaluate the biological parameters and methods to differentiate instars and species of Coleoptera of forensic importance. The species were reared at 25°C and $\pm 70\%$ de RH and the differentiation was tested using cuticular hydrocarbons and COI gene sequences (mtDNA). The instar duration varied between species of the same genera, emphasizing the importance of a species-specific identification. Furthermore, this study was the first to record the life cycle of *Oxelytrum erythrurum*. The differentiation of *Oxelytrum* spp. was possible using cuticular hydrocarbons and in *O. erythrurum* it was possible to separate the larval instars. All species could be differentiated by COI gene using Neighbor-Joining, being the intra-specific variation less than the inter-specific. The sequences will be published on-line (GenBank), making it possible that, as more sequences of specimens of other regions are available, that this differentiation gets clearer. The present study contributed to the use of these species as entomological evidences aiding to solve legal and civil cases.

1. Introdução Geral

A ordem Coleoptera é a mais rica e diversa da classe Insecta com 357.899 espécies descritas, correspondendo a cerca de 40% de todos os insetos e 30% de todos os animais (Lawrence & Britton 1990). Na região Neotropical são registradas 72.476 espécies, sendo 26.755 para o Brasil, incluídas em 4.351 gêneros (Costa 2000).

Devido ao grande número de espécies e a grande variedade dos habitats e nichos que ocupam, muitas espécies interagem com o homem. Essa fauna é um dos principais objetos de estudo da entomologia forense, em que o estudo dos insetos é aplicado na solução de casos criminais e disputas judiciais. (Pujol-Luz *et al.* 2008). Uma das mais conhecidas aplicações dessa ciência é a estimativa do intervalo pós-morte (IPM), que pode ser baseada na sucessão ecológica das comunidades de insetos associadas a carcaças e/ou no desenvolvimento dos imaturos que utilizam este tipo de substrato (Catts & Haskel 1990).

Dentre a coleopterofauna associada a carcaças, há várias famílias que contém espécies necrófagas (Mise *et al.* 2007; Grisales *et al.* 2010), sendo que na América do Sul, dentre as principais famílias estão Silphidae (Luederwaldt 1911; Monteiro-Filho & Penereiro 1987; Moura *et al.* 1997; Carvalho *et al.* 2000; Wolff *et al.* 2001; Barreto *et al.* 2002; Centeno *et al.* 2002; Mise *et al.* 2007; Velásquez 2008; Grisales *et al.* 2010), Cleridae (Luederwaldt 1911; Souza & Linhares 1997; Carvalho *et al.* 2000; Wolff *et al.* 2001; Centeno *et al.* 2002; Iannaccone 2003; Carvalho *et al.* 2004; Cruz & Vasconcelos 2006; Mise *et al.* 2007) e Dermestidae (Luederwaldt 1911; Souza & Linhares 1997; Carvalho 2000; Wolff *et al.* 2001; Centeno *et al.* 2002; Iannaccone 2003; Carvalho *et al.* 2004; Velásquez 2008; Mise *et al.* 2007; Grisales *et al.* 2010), foco deste trabalho.

1.1. Silphidae

São conhecidos como “carrion beetles” devido a sua abundância em carcaças de vertebrados nas regiões temperadas e sub-árticas. Contudo sua distribuição não está limitada a essas regiões, ocorrendo em menor número na região tropical.

No Brasil a família é representada por espécies do gênero *Oxelytrum*, cujas larvas e adultos foram relatadas alimentando-se e ovipositando em carcaças expostas (Peck & Anderson 1985), embora os adultos sejam preferencialmente predadores. A importância do gênero como indicador forense cresce também pelas espécies que ocorrerem nos estágios iniciais da decomposição (p. ex. Centeno *et al.* 2002; Mise *et al.* 2007; Ururahy-Rodrigues *et al.* 2010), em áreas rurais e de floresta da região Neotropical. Existem 8 espécies do gênero, sendo que *O. cayennense* (Sturm, 1826), *O. discicolle* (Brullé, 1840) e *O. erythrurum* (Blanchard, 1840) foram registradas até o momento em trabalhos de entomologia forense no Brasil. A diferenciação dos adultos das espécies pode ser feita com base na chave de Peck & Anderson (1985), contudo, não há até o momento métodos para diferenciá-las pelos estágios imaturos.

Oxelytrum discicolle foi registrada no Brasil em Curitiba e Campinas em carcaças de porco e rato (Moura *et al.* 1997; Carvalho *et al.* 2000; Mise *et al.* 2007) havendo relatos de que estão associados também a carcaças de mamíferos silvestres como *Didelphis marsupialis* e *Bradypus tridactylus*, além de anfíbios (Velásquez & Vilorio 2009). Sabe-se, no entanto, que sua distribuição engloba quase todo o Brasil, sendo ainda a espécie mais comumente coletada de Silphidae (Peck & Anderson 1985). A espécie é mais abundante em carcaças grandes, ocorrendo durante quase todo o processo de decomposição, sendo sua presença condicionada à vegetação circundante e à temperatura (Ferreira *et al.* 2006).

A duração de cada estágio de vida desta espécie foi estudada por Velásquez & Vilorio (2008), utilizando frango como alimento. A menor duração média de ovo a adulto encontrada foi de $20,33 \pm 0,89$ dias a 28°C. Os autores concluíram que o tempo de desenvolvimento é reduzido conforme a temperatura aumenta, fornecendo o grau dia acumulado a 15, 20 e 28°C para a espécie atingir cada estágio do ciclo de vida. Contudo ainda são necessários mais estudos para verificar se há variação no desenvolvimento de acordo com o tipo de alimento e frente à diferentes temperaturas. A larva de último ínstar, bem como a pupa da espécie foram descritas detalhadamente e ilustradas por Costa *et al.* (1988).

Oxelytrum erythrurum foi registrada em carcaças em Curitiba (dados não publicados), mas sabe-se que sua distribuição engloba Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Peck & Anderson, 1985). Oliva (2001) cita que a espécie foi a única de Silphidae a ser encontrada em casos forenses na província de Buenos Aires. O mesmo não ocorre na cidade de Curitiba, onde são encontradas ambas as espécies. Oliva (2004) cita que os exemplares identificados como *Hyponecrotodes* sp. por Centeno *et al.* (2002) são na verdade *O. erythrurum*, que apareceram no início da decomposição, dois dias após a exposição de uma carcaça de porco. O último ínstar larval da espécie foi descrito de forma detalhada, sendo acompanhada por ilustrações no trabalho de Oliva (2004). No entanto, não há até o momento estudos sobre a biologia desta espécie.

Oxelytrum cayennense ocorre em carcaças na Amazônia (Mise *et al.* 2009), mas sua distribuição é registrada até São Paulo (Peck & Anderson, 1985). Ururahy-Rodrigues *et al.* (2010) observaram adultos se alimentando tanto de tecidos moles quanto de larvas e ovos de moscas, enquanto que as larvas são estritamente necrófagas. Os autores ainda citaram que a espécie coloniza a carcaça um dia após a morte, com o

aparecimento das larvas 5-6 dias após a morte. Não há até o momento nenhum trabalho que trate dos parâmetros biológicos da espécie, nem descrições da larva.

1.2. Cleridae

Estes besouros são principalmente predadores de outros insetos, tanto no estágio larval quanto no adulto (Opitz 2002). Espécies de *Necrobia* podem se desenvolver em tecidos gordurosos de animais mortos, ou, algumas vezes, em substâncias oleosas de plantas, ou em larvas de outros insetos necrófilos. Já as larvas de *Necrobia* parecem usualmente ser saprófagas, contudo podem algumas vezes predação larvas de Diptera (Scott 1919). *Necrobia ruficollis* (Fabricius, 1775) e *Necrobia rufipes* (DeGeer, 1775) ocorrem no Brasil em carcaças (Luederwaldt 1911; Centeno *et al.* 2002; Mise *et al.* 2007) e produtos de origem animal (Gredilha & Lima 2007). Não há atualmente chaves de identificação para os imaturos deste gênero.

Necrobia rufipes tem seu ciclo de vida bem conhecido por ser uma espécie que causa danos em produtos armazenados, sendo estabelecidos até métodos de criação massal para estudos em laboratório (Hasan & Phillips 2010). Os ovos têm aproximadamente 1mm e coloração branco-leitosa. As larvas têm quatro ínstaes, sendo que o último cria um pupário com detritos do substrato. No Brasil, o único estudo feito sobre o ciclo de vida foi o de Corrêa (2006), que observou apenas 3 ínstaes na fase larval.

Necrobia ruficollis ocorre no Brasil em número reduzido quando comparado com *N. rufipes* (Luederwaldt 1911; Mise *et al.* 2007) Scott (1919), não observou predação quando isolou larvas da espécie com ovos, larvas e pupário de moscas vivos, o que indica que as larvas da espécie são preferencialmente necrófagas.

1.3. Dermestidae

Também conhecidos como “skin beetles”, eles são primariamente necrófagos que se alimentam de pele seca e outros tecidos moles de animais, como pêlos, penas, lã e couro. Podem também se alimentar de carpete, carne seca, insetos mortos, sendo que algumas espécies são pragas de grãos, sementes, cortiça e cereais.

Dermestes maculatus De Geer, 1774 é o dermestídeo mais comum em carcaças e quando encontrados, podem ser uma importante evidência forense (Kulshrestha & Satpathy 2001), principalmente devido a sua distribuição cosmopolita. É uma conhecida praga de peixe seco e ração de peixe, que pode causar danos a estruturas de madeira entre outros materiais, quando a larva está se preparando para empupar (Turner 1986; Wildey & Wayman 1979). No âmbito forense, Schroeder *et al.* (2002) reportaram que a espécie pode reduzir um homem a restos esqueletinizados em apenas cinco meses dentro de um apartamento fechado. O processo de decomposição duraria muito mais na ausência dessa espécie. Apesar de haver alguns artigos sobre a biologia dessa espécie (Bellemare & Brunelle 1950; Scoggin & Tauber 1951; Jacob & Fleming 1985; Raspi & Antonelli 1995), é preciso estudar seu desenvolvimento em outros meios, considerando que a duração dos estágios pode variar conforme a alimentação, além do número de instares estar ligado ao sexo (Parra & Haddad 1989).

1.4. Objetivos

O presente estudo teve duas finalidades distintas. Primeiramente buscou estudar os parâmetros biológicos das principais espécies de besouros com potencial para serem utilizadas como indicadores de IPM. A outra finalidade foi procurar alternativas metodológicas à morfologia na diferenciação de espécies de Coleoptera de interesse

forense. Para tanto esse trabalho foi subdividido em três capítulos: (1) **Biologia de *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840), *Oxelytrum erythrurum* (Blanchard, 1840), *Necrobia rufipes* (DeGeer, 1775), *Necrobia ruficollis* (Fabricius, 1775) e *Dermestes maculatus* DeGeer, 1774;** (2) **Variação ontogenética e interespecífica em espécies de Coleoptera de interesse forense baseada em hidrocarbonetos cuticulares;** (3) **Análise do gene citocromo oxidase I na diferenciação de espécies de Coleoptera de interesse forense**

Referências

- Barreto, M.; M. E. Burbano & P. Barreto. 2002. Flies (Calliphoridae, Muscidae) and beetles (Silphidae) from human cadavers in Cali, Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **97**: 137-138.
- Bellemare, E. R. & L. Brunelle. 1950. Larval and pupal development of *Dermestes maculatus* Degeer under controlled conditions of temperature and relative humidity. **The Canadian Entomologist** **82**: 22-24.
- Carvalho, L. M. L.; P. J. Thyssen; A. X. Linhares & F. A. B. Palhares. 2000. A checklist of Arthropods associated with pig carrion and human corpses in southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **95**: 135-138.
- Carvalho, L. M. L.; P. J. Thyssen; M. L. Goff & A. X. Linhares. 2004. Observations on the succession patterns of necrophagous insects on a pig carcass in an urban area of southeastern Brazil. **Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology** **5**: 33-39.
- Catts, E. P. & N. H. Haskell. (Eds.). 1990. **Entomology and Death: A Procedural Guide**. Clemson, SC. Joyce's Print Shop. 180 pp.
- Centeno, N.; M. Maldonado & A. Oliva. 2002. Seasonal patterns of arthropods occurring on sheltered and unsheltered pig carcasses in Buenos Aires Province (Argentina). **Forensic Science International** **126**: 63-70.
- Costa, C. 2000. Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales. p. 99-114. In: F. Martín-Piera; J. J. Morrone & A. Melic (Eds). PrIBES. **Proyecto Iberoamericano de Biogeografía y Entomología Sistemática. Zaragoza (Vol. 1)**. Villa de Leyva, Colômbia. Sociedad Entomológica Aragonesa. 326 pp.

- Costa, C. S. A. Vanin & S. A. Casari-Chen. 1988. **Larvas de Coleoptera do Brasil**. São Paulo. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, V + 282 p., 165 ests.
- Corrêa, R. 2006. **Morfologia do adulto e alguns aspectos biológicos de *Necrobia rufipes* (DeGeer, 1775) (Coleoptera, Cleridae)**. Monografia de conclusão de curso em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.
- Cruz, T. M. & S. D. Vasconcelos. 2006. Entomofauna de solo associada à decomposição de carcaça de suíno em um fragmento de mata atlântica de Pernambuco, Brasil. **Biociências 14**: 193-201.
- Ferreira, P.S.F.; E. M. Pires; R. N. C. Guedes; M. Mendes & L. A. Coelho. 2006. Seasonal abundance and sexual variation in morphometric traits of *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae) in a Brazilian Atlantic Forest. **Biota Neotropica 6**: 1-7.
- Gredilha, R. & A. F. Lima. 2007. First record of *Necrobia rufipes* (De Geer, 1775) (Coleoptera; Cleridae) associated with pet food in Brazil. **Brazilian Journal of Biology 67**(1): 187.
- Grisales, D.; M. Ruiz & S. Villegas. 2010. Insects associated with exposed decomposing bodies in the Colombian Andean Coffee Region. **Revista Brasileira de Entomologia 54**(4): 637-644.
- Hasan, M. M. & T. W. Phillips. 2010. Mass-rearing of the redlegged ham beetle, *Necrobia rufipes* De Geer (Coleoptera: Cleridae) for laboratory research. **Journal of Stored Products Research 46**: 38-42.
- Iannacone, J. 2003. Artropofauna de importancia forense en un cadáver de cerdo en el Callao, Perú. **Revista Brasileira de Zoologia 20**: 85-90.
- Jacob, T. A. & D. A. Fleming. 1985. The effect of constant temperature and humidity on the egg period of *Dermestes maculatus* DeGeer and the influence of free water

- upon the developmental period (Col. Dermestidae). **Entomologist's Monthly Magazine** **121**:19-23.
- Kulshrestha, P. & D. K. Satpathy. 2001. Use of beetles in forensic entomology. **Forensic Science International** **120**, 15-17.
- Lawrence, J. F. & E. B. Britton. 1991. Coleoptera. p. 543-683. *In* **The insects of Australia**. Carlton. Melbourne University Press. 1137 pp.
- Luederwaldt, G. 1911. Os Insectos Necrophagos Paulistas. **Revista do Museu Paulista** **8**: 414-433.
- Mise, K. M.; L. M. Almeida & M. O. Moura. 2007. Levantamento da fauna de Coleoptera que habita a carcaça de *Sus scrofa* L., em Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Entomologia** **51**: 358-368.
- Monteiro-Filho, E. L. A. & J. L. Penereiro. 1987. Estudo de decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia** **47**: 289-295.
- Moura, M. O.; C. J. B. de Carvalho & E. L. A. Monteiro-Filho. 1997. A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, State of Parana. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** **92**: 269-274.
- Oliva, A. 2001. Insects of forensic significance in Argentina. **Forensic Science International** **120**: 145-154.
- Oliva, A. 2004. Description of the larva of *Oxelytrum erythrurum* (Blanchard, 1849) (Coleoptera: Silphidae). **Bulletin et Annales de la Société Royale Belge d'Entomologie** **140**: 141-144.
- Opitz, W. 2002. 73. Cleridae Latreille 1804, p. 267-280. *In*: R. H. Arnett; M. C. Thomas & P. E. Skelley (Eds.) **American Beetles: Volume 2**. Boca Raton, London, New York e Washington D.C. CRC Press. xix+861 p.

- Peck, S. B. & R. S. Anderson. 1985. Taxonomy, phylogeny and biogeography of the carrion beetles of Latin America (Coleoptera: Silphidae). **Quaestiones Entomologicae** **21**: 247-317.
- Pujol-Luz, J. R.; L. C. Arantes & R. Constantino. 2008. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). **Revista Brasileira de Entomologia** **52**: 485-492.
- Raspi, A. & R. Antonelli. 1995. Influence of constant temperature on the development of *Dermestes maculatus* Deg. (Coleoptera Dermestidae). **Frustula entomologica** **18**: 169-176.
- Schroeder, H.; H. Klotzbach; L. Oesterhelweg & K. Püschel. 2002. Larder beetles (Coleoptera, Dermestidae) as an accelerating factor for decomposition of a human corpse. **Forensic Science International** **127**: 231-236.
- Scoggin, J. K. & O. E. Tauber. 1951. The bionomics of *Dermestes maculatus* Deg. II. larval and pupal development at different moisture, levels and on various media. **Annals of the Entomological Society of America** **44**: 544-550.
- Scott, H. 1919. Notes on the biology of *Necrobia ruficollis*, Fabr. (Coleoptera, Cleridae). **Annals of Applied Biology** **6**(2): 101-115.
- Souza, A.M. & A. X. Linhares. 1997. Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. **Medical and Veterinary Entomology** **11**: 8-12.
- Turner Jr., E.C. 1986. Structural and litter Pests. **Poultry Science** **65**: 644-648.
- Ururahy-Rodrigues, A.; J. A. Rafael; J. R. Pujol-Luz; A. L. Henriques, M. M. C. Queiroz; R. R. Barbosa & M. N. Baroni. 2010. Association of *Oxelytrum cayennense* (Silphidae, Coleoptera) with pig carcasses (*Sus scrofa*, Suidae) in Terra Firme Áreas in Manaus, Amazonas, Brazil. **EntomoBrasilis** **3**(2): 45-48.

- Velásquez, Y. 2008. A checklist of arthropods associated with rat carrion in a montane locality of northern Venezuela. **Forensic Science International** **174**: 67-69.
- Velásquez, Y. & A. L. Vilorio. 2009. Effects of temperature on the development of the Neotropical carrion beetle *Oxelytrum discicollae* (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae). **Forensic Science International** **185**: 107-109.
- Willey, K. B. & C. Wayman. 1979. The hide beetle (*Dermestes maculatus*) as a deep pit pest in poultry houses. **ADAS Quarterly Review** **34**: 187–193.
- Wolff, M.; A. Uribe; A. Ortiz & P. Duque. 2001. A preliminary study of forensic entomology in Medellín, Colombia. **Forensic Science International** **120**: 53-59.

Capítulo I

Biologia de *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840), *Oxelytrum erythrurum* (Blanchard, 1840), *Necrobia rufipes* (DeGeer, 1775), *Necrobia ruficollis* (Fabricius, 1775) e *Dermestes maculatus* DeGeer, 1774

Resumo

Uma das aplicações mais conhecidas da entomologia forense é a estimativa do IPM, na qual o conhecimento da biologia das espécies é necessário. Os Coleoptera, por terem ciclo de vida com maior duração do que os dípteros são importantes principalmente nos estágios avançados de decomposição. Alguns dos principais besouros que se desenvolvem em carcaças no Brasil são *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840), *O. erythrurum* (Blanchard, 1840), *Necrobia rufipes* (DeGeer, 1775), *Necrobia ruficollis* (Fabricius, 1775) e *Dermestes maculatus* DeGeer, 1774, espécies em que há uma carência de estudos da duração dos estágios em substratos animais. Portanto o objetivo desse trabalho foi estudar a duração do ciclo, sua variação conforme a espécie dentro de um mesmo gênero (*Oxelytrum* spp. e *Necrobia* spp.), sexo (*D. maculatus*), além de, quando possível, descrever aspectos comportamentais. As criações foram feitas a 25°C, $\pm 70\%$ de UR, 12h de fotofase. Os insetos foram mantidos em potes plásticos forrados com papel filtro umedecido e alimento. As espécies tiveram duração dos estágios semelhantes ao encontrado na literatura, estando provavelmente as diferenças ligadas à procedimentos metodológicos. Houve diferença significativa entre ovo, 1º e 2º ínstar, além da duração total entre as espécies de *Oxelytrum* e entre o 1º e 4º ínstar das espécies de *Necrobia*. A variação no número de ínstar de *D. maculatus* não pôde ser explicada por diferenças entre os sexos. Este trabalho corrobora a importância de estudos de biologia das espécies de importância forense, já que generalizações podem levar a erros no cálculo do IPM.

Abstract

One of its most known applications is the PMI estimation, in which the biology of the species is necessary. The Coleoptera, due to having a longer life cycle in comparison with flies, are important mainly on the advanced stages of decomposition. Some of the main beetles that rear on carcasses in Brazil are *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840), *O. erythrurum* (Blanchard, 1840), *Necrobia rufipes* (DeGeer, 1775), *Necrobia ruficollis* (Fabricius, 1775) and *Dermestes maculatus* DeGeer, 1774, species in which there is a lack of studies describing the stadium in products of animal origin. Therefore the objective of this study is to know better the life cycle, variations among species inside the genera (*Oxelytrum* spp. and *Necrobia* spp.), sex (*D. maculatus*), as well as describing behavioral aspects whenever possible. The rearings were done at 25°C, $\pm 70\%$ RH, 12:12h (L:D). The insects were kept in plastic vials with filter paper moistened daily and food. The species had similar stage durations when compared with other papers, probably the differences being due to methodological differences. There was significant difference between egg, 1st and 2nd instar, as well as total development between species of *Oxelytrum* and between the 1st and 4th instar of *Necrobia* species. The variation in the instar number of *D. maculatus* could not be explained by differences between sexes. Some behavioral aspects were described to contribute to the biology of the species. The present study corroborates the importance of studying each species biology, as generalization may lead to errors.

1. Introdução

Uma carcaça de vertebrado é um exemplo marcante de distribuição pontual, recurso efêmero (Hanski 1987). Sua decomposição pode variar segundo a ação de fatores abióticos, como temperatura, umidade, precipitação ou insolação, além de fatores bióticos, representados pela fauna e flora decompositoras. Dentre esta fauna destacam-se fungos, bactérias e vários artrópodos, principalmente insetos, cujo acréscimo ou substituição sequencial de suas espécies ao longo do processo de decomposição é chamado de sucessão entomológica (Bornemissza 1957). Entretanto, a relevância desse processo tem ido além da ciclagem de nutrientes (Cornaby 1974; Hanski 1987). Esse período de tempo em que os insetos vivem na carcaça do animal pode ser utilizado para se determinar em quais circunstâncias a morte ocorreu e ainda estimar o intervalo pós-morte (IPM) (Keh 1985; Amendt *et al.* 2007) dentro da Entomologia Forense. Tais estimativas podem ser baseadas na biologia (IPM mínimo) ou na composição da comunidade de insetos encontrados em cadáveres (IPM máximo). Como normalmente a duração do ciclo de coleópteros é mais longa que a de dípteros, Coleoptera pode ganhar importância nos estágios iniciais quanto nos mais avançados de decomposição (Midgley *et al.* 2010).

A coleopterofauna não compreende somente insetos necrófagos, havendo espécies predadoras/parasitóides, onívoras e acidentais. Então, embora se dê ênfase maior aos insetos necrófagos, o uso de dados de biologia para cálculo do IPM não está limitado somente a eles (Midgley *et al.* 2010). Dentre os coleópteros podemos ter vários exemplos de espécies parasitóides (p. ex. *Aleochara pseudochrysorrhoea* (Caron *et al.* 2008)) e predadores (p. ex. maioria das espécies de Staphylinidae e Histeridae), cujas larvas estão intrinsecamente associadas a corpos. O uso de tais espécies é possível, mas

está condicionada a presença de suas presas. Tendo isso em vista, as espécies necrófagas são mais comumente usadas para cálculo do IPM mínimo. Apesar dessa importância, existem poucas informações sobre os padrões de desenvolvimento de besouros de importância forense.

No Brasil há um número crescente de estudos da sucessão em carcaças (p. ex. Carvalho *et al.* 2004; Mise *et al.* 2007; Moretti *et al.* 2008), contudo estudos sobre a biologia das espécies, principalmente de Coleoptera, não são tão abundantes. Por haver muitas espécies de interesse forense cosmopolitas, na maioria dos casos as estimativas baseiam-se em trabalhos feitos em outros países, principalmente do hemisfério norte. Exemplos dentro dos coleópteros de interesse forense são *Necrobia* spp. e *Dermestes* spp., sobre as quais existem vários trabalhos descrevendo os parâmetros biológicos, principalmente por serem espécies cosmopolitas. Contudo, deve-se lembrar apenas uma pequena porção do “pool” gênico é usada quando uma espécie é introduzida em uma nova área (Poutsma *et al.* 2008). Consequentemente, os indivíduos fundadores podem produzir uma população com características diferentes das populações fonte. Portanto seria relevante avaliar se as populações encontradas no Brasil têm os mesmos requisitos abióticos para o desenvolvimento.

Além disso, o tempo de desenvolvimento das espécies pode variar entre espécies dentro do mesmo gênero. Por isso, Benecke & Wells (2001) afirmam que a identificação adequada das espécies é normalmente um primeiro passo fundamental no uso da evidência entomológica em uma investigação legal, em função da drástica variação entre espécies no período de colonização, duração do ovo e taxa de crescimento larval.

Tendo em vista a importância da biologia nas estimativas de IPM, o presente trabalho buscou conhecer os parâmetros biológicos das principais espécies de Coleoptera associados à carcaças no Brasil.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar os parâmetros biológicos e comportamentais de espécies de Coleoptera de interesse forense.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a duração dos estágios de *Dermestes maculatus* DeGeer, 1774, *Necrobia rufipes* (DeGeer, 1775), *N. ruficollis* (Fabricius, 1775), *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) e *O. erythrurum* (Blanchard, 1840).
- Comparar a duração dos estágios de vida entre as espécies de *Oxelytrum* e entre as de *Necrobia*.
- Testar se a duração do ciclo de *D. maculatus* varia conforme o sexo.
- Descrever aspectos comportamentais ainda não registrados para as espécies de *Oxelytrum*.

3. Metodologia

A seleção destas espécies se deu com base em sua abundância em estudos de sucessão da fauna cadavérica, assim como pelo seu potencial forense. Além disso,

foram feitas análises para comparar espécies do mesmo gênero que ocorrem em simpatria, de modo a evitar imprecisões no cálculo do IPM.

Todos os bioensaios foram conduzidos em BOD's com temperatura de 25° C, umidade relativa de aproximadamente 70% e fotofase de 12h, em sala climatizada.

3.1. *Oxelytrum discicolle* e *O. erythrurum*

A criação foi feita com indivíduos coletados em carcaça de *Sus scrofa* Linnaeus, 1758, em clareira localizada num capão a 25°25'S e 49°14'W, em Curitiba-PR. A área é um remanescente de floresta ombrófila mista com três estratos bem definidos, solo de umidade moderada e pouca declividade.

Os adultos foram acondicionados em potes plásticos contendo carne moída fresca, terra vegetal e papel filtro umedecido. Todas as posturas do dia foram acondicionadas em potes contendo terra umedecida. Ao eclodirem os ovos eram separados, sendo as larvas transferidas para potes plásticos com papel filtro umedecido e carne moída fresca. Quando as larvas atingiam o terceiro ínstar, foi acrescentado terra, no mesmo recipiente, como substrato para empupamento. Para análise das oviposições, foram formados casais a partir dos indivíduos que emergiram, sendo a terra vistoriada diariamente à procura de ovos. A sexagem foi feita seguindo os dimorfismos sexuais estabelecidos por Peck & Anderson (1985). Os parâmetros biológicos foram anotados diariamente.

Para que os dados fossem comparados par a par, necessitavam ter a mesma quantidade de amostras. Por isso o número de amostras, para cada uma das espécies, ficou limitado ao menor número de repetições obtido, sendo feita uma seleção aleatória

dos dados. Esses dados foram testados quanto à normalidade e quanto a homogeneidade das variâncias (Quinn & Keough 2002), sendo posteriormente feito o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) no programa Statistica 7.0. Nos casos em que as premissas para os testes paramétricos não foram atingidas, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (U).

3.2. *Necrobia rufipes* e *N. ruficollis*

Para a criação foram utilizados espécimes de *Necrobia rufipes* provenientes de Campina Grande, Paraíba, de *Necrobia ruficollis* provenientes de Campinas, São Paulo, além de exemplares provenientes de Curitiba, Paraná. Foram ofertadas fatias de bacon de aproximadamente 0,7 x 0,4 x 1 cm como alimento e papel filtro dobrado como abrigo. As larvas, obtidas a partir das posturas destes espécimes foram criadas individualmente em recipientes plásticos com cerca de 8 cm de diâmetro, para evitar o canibalismo para obtenção da geração parental. Os ovos provenientes dessa geração foram acondicionados em recipientes plásticos com cerca de 3cm de diâmetro, com fatias de bacon como alimento e abrigo, as quais foram mantidas até o final da criação. Quando as larvas atingiram o terceiro ínstar, foi ofertado um pedaço de papelão corrugado para ser utilizado como abrigo para a fase de pupa. O período de pupa foi considerado a partir do instante em que as larvas fechavam o papelão com uma secreção branca. Apesar das larvas não empuparem imediatamente, o rompimento desta célula criada por eles poderia afetar seu desenvolvimento. Da mesma forma, o final da fase de pupa foi considerado quando os adultos rompiam esta célula. Os parâmetros biológicos foram anotados diariamente. A duração das espécies foi comparada com o teste de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$) feito no programa Statistica 7.0.

3.3. *Dermestes maculatus*

Tendo em vista que *Dermestes maculatus* já foi relatada no Brasil alimentando-se em ração animal, os bioensaios foram conduzidos nesse meio. Os exemplares utilizados foram provenientes de Brasília - DF. As posturas foram alocadas em potes plásticos transparentes com cerca de 3cm de diâmetro. Ao emergirem, as larvas foram individualizadas em potes plásticos transparentes do mesmo tamanho com ração para cachorro (Alpo®) e papel filtro umedecido e vistoriadas diariamente. A sexagem dos adultos foi feita logo após a emergência, observando-se a presença de um pêlo dourado no quarto esternito abdominal dos machos (Bellemare & Brunelle 1950).

Para testar se havia diferença entre os sexos, foram feitas medições de comprimento e largura com base em exemplares provenientes da criação. Esses exemplares foram conservados em álcool e a medição foi feita com o auxílio de um microscópio estereoscópio Wild M5 com ocular micrométrica. Para o comprimento foi considerado desde o ápice da cabeça até o final do abdômen, não incluindo a genitália quando esta estava exposta, enquanto que para a largura mediu-se o maior valor encontrado. As medições foram comparadas entre os sexos utilizando o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) no programa Statistica 7.0.

4. Resultados e Discussão

4.1. *Oxelytrum discicolle*

Foram observados 13 casais, dos quais apenas três tiveram ovos férteis, ocasionando a baixa viabilidade observada (6,70%). A média de ovos por casal foi de $25,23 \pm 22,88$ ovos, variando entre 2 a 81.

Analisando indivíduos oriundos da criação estoque, a duração dos estágios (Fig. 1) foi semelhante ao trabalho de Velásquez & Vilorio (2009) (Tab. I), com valores intermediários às temperaturas e umidade relativa utilizadas, pois, de acordo com as autoras, a espécie reduz seu tempo de desenvolvimento conforme a temperatura aumenta.

Há, no entanto, divergências em relação ao estudo de Velásquez & Vilorio (2009), pois no presente estudo, o ovo durou menos dias, enquanto no desses autores o primeiro ínstar foi menor. Essa diferença pode ter ocorrido em função do alimento utilizado, além de que os autores consideraram a muda com base nos 3 maiores indivíduos de 12 potes com 100 ovos cada. Ou seja, houve uma tendência a reduzir o tempo de desenvolvimento, já que não foram levados em conta os indivíduos com menor taxa de crescimento e que provavelmente demorariam mais para completar o ciclo. Dessa forma o esperado seria que a duração dos estágios onde há crescimento (estádios larvais) fosse menor do que no presente estudo. Isso de fato ocorreu para o primeiro e segundo estádios, porém o mesmo não foi observado no terceiro estágio. O terceiro ínstar acaba por ter uma taxa de crescimento menor do que os instares anteriores, já que o indivíduo cessa de se alimentar para entrar no estágio de pré-pupa. Por ter uma taxa de crescimento menor, não parece haver diferenças na duração entre indivíduos, o que ocasionou o padrão encontrado no presente estudo, onde a média do terceiro estágio se situou entre os valores encontrados por Velásquez & Vilorio (2009) nas temperaturas próximas.

O menor tempo de desenvolvimento de ovo a adulto foi de 20 dias, com média superior ao encontrado por Velásquez & Vilorio (2009) a 28°C e inferior aos valores a 20°C (Tab. I).

A maior mortalidade foi observada na pupa e no último ínstar larval, estádios onde o indivíduo perde a camada de hidrocarbonetos cuticulares (Mise et al. dados não publicados). Dessa forma, a umidade alta, que é benéfica nos primeiros instares, acaba por matar os estádios sem a camada hidrofóbica.

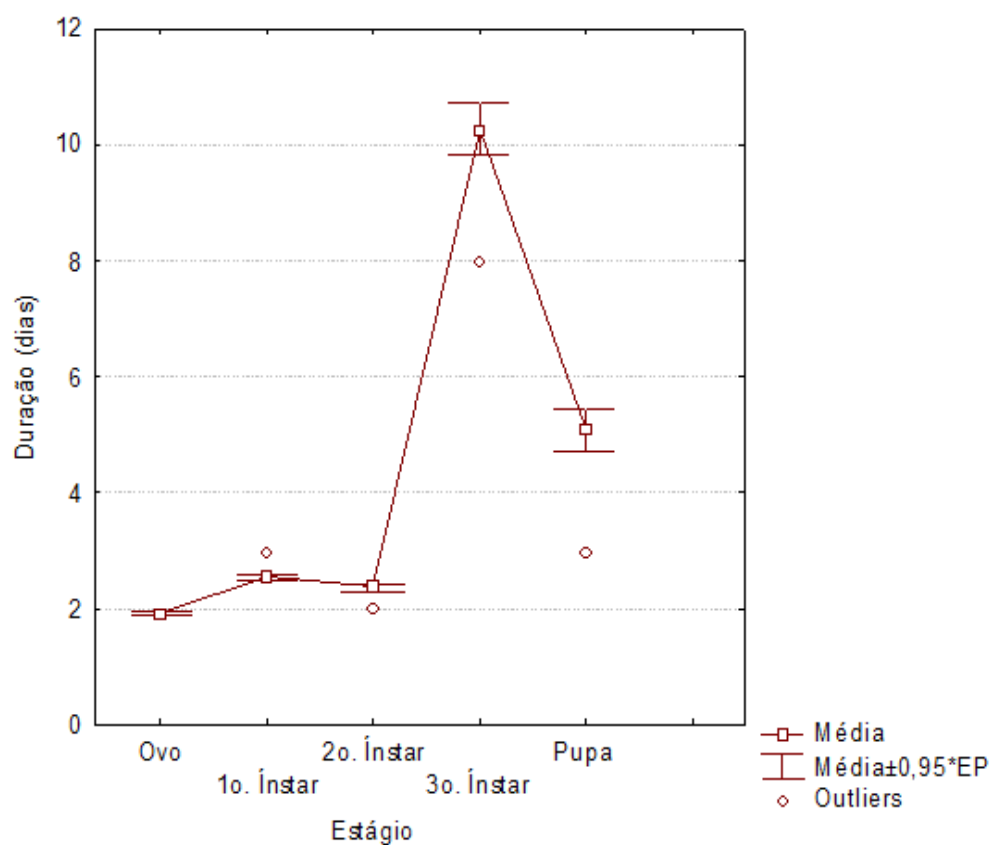


Fig. 1. Duração média (em dias) dos estágios de *Oxelytrum discicolle* (com média encontrada, erro padrão e valores extremos) a 25°C e $\pm 70\%$ de umidade relativa.

Tab. I. Comparação das médias em dias de cada estágio de *Oxelytrum discicolle* do presente estudo com as de Velásquez & Vilorio (2009), nas temperaturas de 15°, 20° e 28 °C, umidade relativa 70-80% e fotofase 12h.

Autor	Velásquez & Vilorio (2009)			Presente estudo
Estágio	15°C	20°C	28°C	25°C
Ovo	5,16 ± 0,38	2,91 ± 0,28	2,91 ± 0,51	1,92 ± 0,61
1º Ínstar	2,58 ± 0,51	2,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	2,53 ± 0,76
2º Ínstar	3,83 ± 1,02	2,00 ± 0,00	1,41 ± 0,51	2,38 ± 0,68
3º Ínstar	15,91 ± 1,16	13,25 ± 1,05	9,00 ± 0,95	10,27 ± 2,27
Pupa	12,50 ± 2,02	9,50 ± 1,67	6,00 ± 0,00	5,10 ± 1,20
Ovo-Adulto	40,00 ± 2,73	29,67 ± 1,92	20,33 ± 0,89	22,00 ± 1,25

4.2. *Oxelytrum erythrurum*

Encontradas em quantidades inferiores a *Oxelytrum discicolle* em campo, foi possível observar apenas 3 casais, além de larvas provenientes da população estoque. O número de ovos variou muito, 55, 13 e 5, o baixo número neste último casal deve-se à morte de um dos adultos 10 dias após a formação dos casais. A viabilidade foi de 6,84%, sendo que apenas o Casal I gerou ovos férteis.

Analisando indivíduos oriundos da criação estoque, foram encontradas as seguintes médias (\pm desvio padrão): ovo $2,13 \pm 0,45$ dias, primeiro ínstar larval $1,74 \pm 0,58$, segundo ínstar larval $1,47 \pm 0,60$, terceiro ínstar larval $9,40 \pm 1,26$ dias e pupa $5,52 \pm 0,89$ dias (Fig. 2). O menor tempo de desenvolvimento encontrado de ovo a adulto foi de 17 dias. Este tempo é menor do que ocorre em *O. discicolle*. Contudo como a quantidade de indivíduos que chegaram ao estágio adulto foi maior em *O. erythrurum*, a diferença pode ser devido a amostragem. A média da duração de ovo a adulto com o desvio padrão foi de $20 \pm 1,64$ dias.

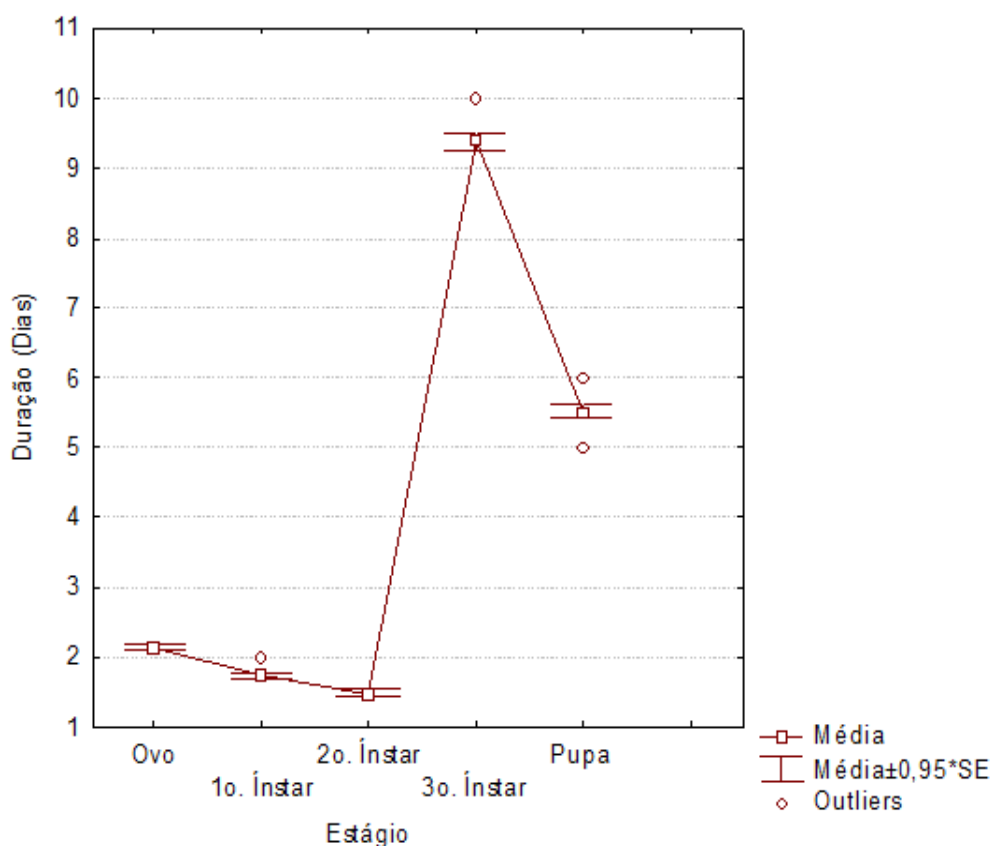


Fig. 2. Duração média (em dias) dos estágios de *Oxelytrum erythrurum* (com média encontrada, erro padrão e valores extremos) a 25°C, $\pm 70\%$ de umidade relativa com fotofase de 12h.

Considerando que este é o primeiro trabalho sobre a biologia de *Oxelytrum erythrurum*, pode-se estabelecer que a espécie apresenta parâmetros similares a *O. discicolle*. A maior mortalidade foi observada na pupa e no último ínstar larval, estágios onde o indivíduo fica mais vulnerável, como citado para *O. discicolle*.

4.3. Comparação entre as espécies de *Oxelytrum*

Houve diferença significativa na duração de ovo, 1º ínstar e 2º ínstar, contudo não houve diferença significativa entre o 3º ínstar e pupa das duas espécies (Tab. II). O

terceiro ínstar, por ser o último estágio larval, é o mais longo, pois a larva procura um lugar adequado para empupar. Isso faz com que haja uma grande variação nos dados. Já para o estágio de pupa, em função das poucas observações em *O. discicolle*, a amostragem para a comparação com *O. erythrurum* foi parca. Por consequência, enquanto a menor duração encontrada em *O. discicolle* foi 20 de dias, em *O. erythrurum* foi de 17 dias.

Tab. II. Estágios de desenvolvimento de *Oxelytrum discicolle* e *Oxelytrum erythrurum*, com os testes utilizados, F ou U, e a probabilidade de serem iguais. Valores significativos estão em negrito.

Estágio	Teste usado	F (teste Tukey)/ U (teste Mann-Whitney)	P
Ovo	Teste Tukey	1,63973	0,005262
1º Ínstar	Teste Tukey	1,59284	0,000000
2º Ínstar	Teste Mann-Whitney	1345,5	0,000000
3º Ínstar	Teste Tukey	4,54962	0,735613
Pupa	Teste Mann-Whitney	34,5	0,241300
Ovo-Adulto	Teste Mann-Whitney	3	0,000400

4.4. Comportamento de *Oxelytrum discicolle* e *O. erythrurum*

Durante as coletas não foi observado o comportamento relatado para outros grupos de Silphidae, onde o macho eleva o abdômen para liberar feromônios (Haberer *et al.* 2008).

Quando os insetos são manuseados, tanto larvas quanto adultos, liberam um líquido viscoso de cor marrom pela extremidade anal. Secreção similar também é encontrada em *Necrodes surinamensis* (Silphidae), a qual consiste em uma mistura de ácidos alifáticos e álcoois terpenos que serve para defesa contra outros insetos (Roach *et al.* 1990).

Os adultos coletados apresentavam ácaros foréticos, tanto na superfície ventral, quanto dorsal (entre o corpo e as asas), os quais permaneceram na criação e se alimentavam dos estágios imóveis (ovo, pré-pupa e pupa) até serem removidos.

As posturas são feitas no solo, enterradas até cerca de 2 cm de profundidade. Os ovos são de cor branco-leitosa, formato oval-arredondado, com aproximadamente 0,15 cm. Em *O. erythrurum* foram observadas oviposições em fêmeas individualizadas, contudo os ovos tinham formato alongado, diferente dos gerados pelas fêmeas dos casais. Todos os ovos desse tipo foram inférteis.

Ao contrário dos adultos, que se alimentam tanto de larvas de dípteros quanto da própria carcaça, as larvas preferem a necrofagia. Ao chegarem ao terceiro ínstar, praticamente cessam de se alimentar e se enterram, formando pela movimentação de seu corpo, uma câmara pupal com terra. Em laboratório, vários indivíduos empuparam na superfície da terra, não formando câmara pupal.

4.5. *Dermestes maculatus*

A duração dos estádios variou entre indivíduos, contudo observou-se um acréscimo gradual na duração média conforme o indivíduo crescia (Fig. 3). Entre os estádios, o ovo teve a menor duração (Tab. III), com média similar a outros estudos na

mesma temperatura, embora com alimentos diferentes (Tab. IV). As oviposições foram observadas no substrato, e em cavidades nas rações, com a maioria dos ovos sendo dispostos individualmente e espaçados, ao contrário do relatado por Osuji (1975).

Tab. III. Duração média (em dias) com o desvio padrão dos estádios de *Dermestes maculatus* a 25°C, $\pm 70\%$ de umidade relativa e 12h de fotofase.

	N	Média \pm Desvio Padrão	Amplitude
Ovo	185	2,86 \pm 0,64	1-4
L1	174	4,13 \pm 1,50	1-12
L2	168	4,11 \pm 1,26	1-11
L3	160	4,69 \pm 1,74	1-13
L4	154	5,08 \pm 1,92	2-15
L5	142	5,54 \pm 2,29	2-14
L6	98	5,57 \pm 2,67	3-16
L7	62	5,69 \pm 4,26	3-33
L8	35	5,71 \pm 2,99	4-21
L9	10	5,60 \pm 0,52	5-6
L10	1	4	4
L11	1	4	4
Último			2-26
íntar	79	14,59 \pm 4,83	
Pupa	79	6,90 \pm 1,06	3-10
Ovo-adulto	77	54,67 \pm 11,85	36-98

Tab. IV. Resumo dos artigos científicos publicados sobre *Dermestes maculatus*, com temperatura, umidade relativa, bem como a duração média de ovos, larva e pupa encontradas. * média por estágio larval (7 mudas)

Autor	Alimento	Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)	Duração média de ovos (dias)	Duração média da larva (dias)	Duração média da pupa (dias)
Bellemare & Brunelle (1950)	Ração canina	25	70		5.8*	8.5*
		25	100		3.9*	8.5*
		28	70		4.8*	7*
		28	100		3.6*	7*
		31	70		4.3*	5.7*
		31	100		2.4*	6*
		34	70		4.2*	5*
		34	100		2.4*	5*
Jacob Fleming (1985)	Ração de peixe com fermento (5:1) e água	25	20/65/90	3.5	-	-
		25	80		33.1	8.5
		25	80		33.9	8.5
		25	80		33.9	8.5
Raspi Antonelli (1995)	Ração de peixe, fermento, queijo e bacon	13	70	-	-	-
		15	70	11	-	-
		18	70	5.974	73.271	17.241
		20	70	5.139	61.059	14.854
		23	70	4.216	44.049	9.992
		25	70	3.198	32.467	8.317
		28	70	2.566	30.194	6.475
		30	70	2.315	27.214	5.603
		33	70	2.2	24.924	5.203
		35	70	1.959	27.167	5
		38	70	1.731	-	-
		40	70	-	-	-
Scoggin & Tauber 1951	Ração de peixe com 7.5% de umidade animal de soja Caseína, fermento e colesterol Frutose, fermento e colesterol	32	70	-	65	5-6
		32	70	-	-	-
		32	70		26.6	23.4
		32	70		5-6	5-6
		32	70		5-6	5-6

Foram observados os parâmetros biológicos de 185 larvas (Tab. III), das quais 77 completaram o ciclo. A duração média da fase de larva foi de 44,96 dias, superior aos valores encontrados por outros autores (ver Tab. IV) na mesma temperatura. Essa variação provavelmente ocorreu em virtude de constituírem populações diferentes, além de diferenças na alimentação, por isso trabalhos com mesma temperatura e umidade tiveram diferentes durações. Deve-se tomar cuidado quando são comparadas temperaturas diferentes, já que o desenvolvimento de *Dermestes maculatus* varia inversamente com a temperatura (Richardson & Goff 2001).

A maior duração do último ínstar larval pode ser explicada pelo comportamento observado por Archer & Elgar (1998). Devido à vulnerabilidade da pupa, vários insetos formam pupários, uma proteção mecânica contra patógenos e predadores. Os autores supracitados, concluem que as larvas podem atrasar a transformação em pupa em virtude de não encontrarem sítios apropriados. Parte das larvas empupou desprotegidas, provavelmente por não encontrarem sítios adequados mesmo quando disponibilizados papel filtro dobrado e enrolado, o que pode ter aumentado o período do último ínstar larval. Isso pode gerar um incremento na duração do 5º. ao 11º. ínstar, já que enquanto há indivíduos que continuam seu desenvolvimento, outros estão à procura de um sítio adequado. Tendo em vista esse problema, os dados foram reunidos em uma categoria artificial “último ínstar larval” para efeito de análise.

O número de ínstaes encontrado variou de 5 a 11, com média de 7,79, próxima do oitavo ínstar como já foi observado por Bellemare & Brunelle (1950). Dada a grande variação, foi testada se o maior número de ínstaes estava ligado ao sexo, como já mencionado por Parra & Haddad (1989) para *Dermestes* e conforme observado por Roe *et al.* (1982) para lepidópteros. A lógica se baseia nas fêmeas normalmente serem maiores em insetos, necessitando de um maior número de ínstaes para atingir o

tamanho adequado. Os machos tiveram comprimento médio de $6,70 \pm 0,89$ (Fig. 3) e largura $3,01 \pm 0,33$ (Fig. 4). Já as fêmeas são ligeiramente maiores com comprimento médio de $7,21 \pm 1,25$ e largura $3,22 \pm 0,32$, não havendo diferença significativa quanto ao comprimento ($F=1,9837$; $p=0,3014$) e largura ($F=1,0276$; $p=0,1525$).

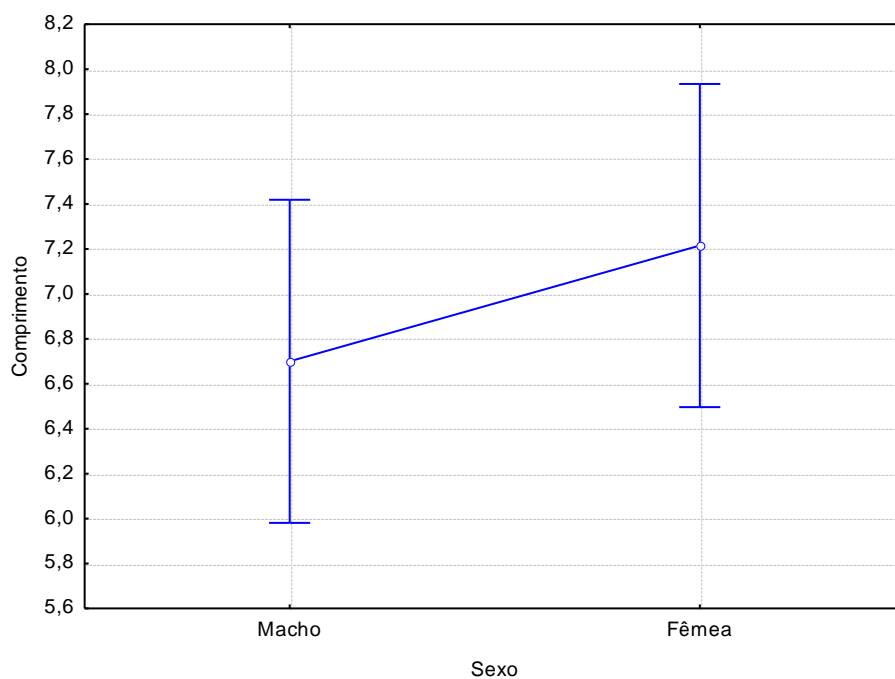


Fig. 3. Comprimento médio (cm) de machos e fêmeas de *Dermestes maculatus* com o intervalo de confiança de 0,95.

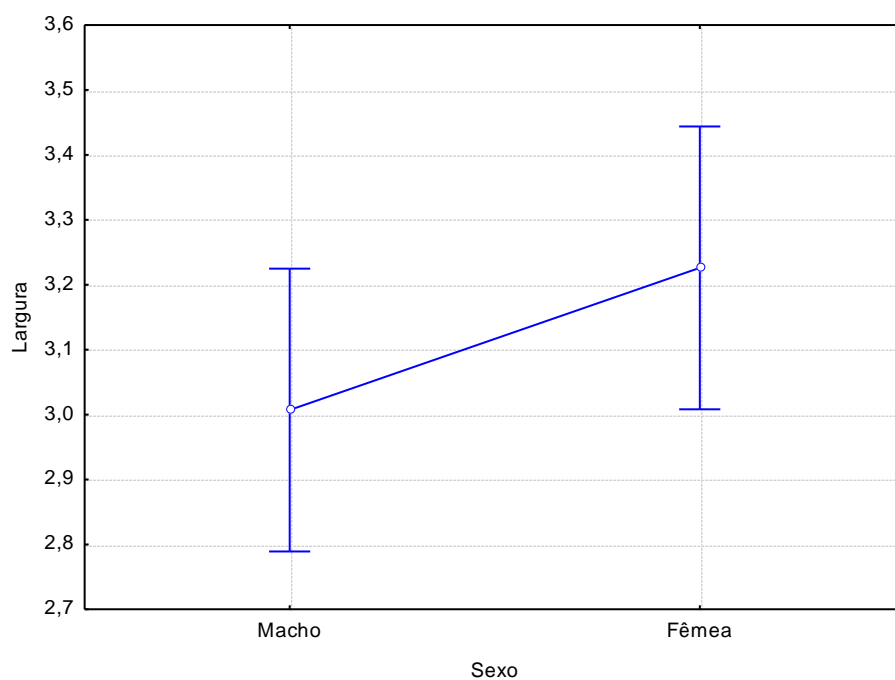


Fig. 4. Largura média (cm) de machos e fêmeas de *Dermestes maculatus* com o intervalo de confiança de 0,95.

Dentre os indivíduos que chegaram à fase adulta, 45 eram fêmeas e 32 machos. Quando comparados, uma maior porcentagem de machos empupou após o 7º e 8º ínstar em relação às fêmeas, já o oposto ocorre no 10º. ínstar (Fig. 5). O número de ínstars não parece estar relacionado ao sexo. A duração não diferiu entre os sexos ($F= 1,29$; $p= 0,455$).

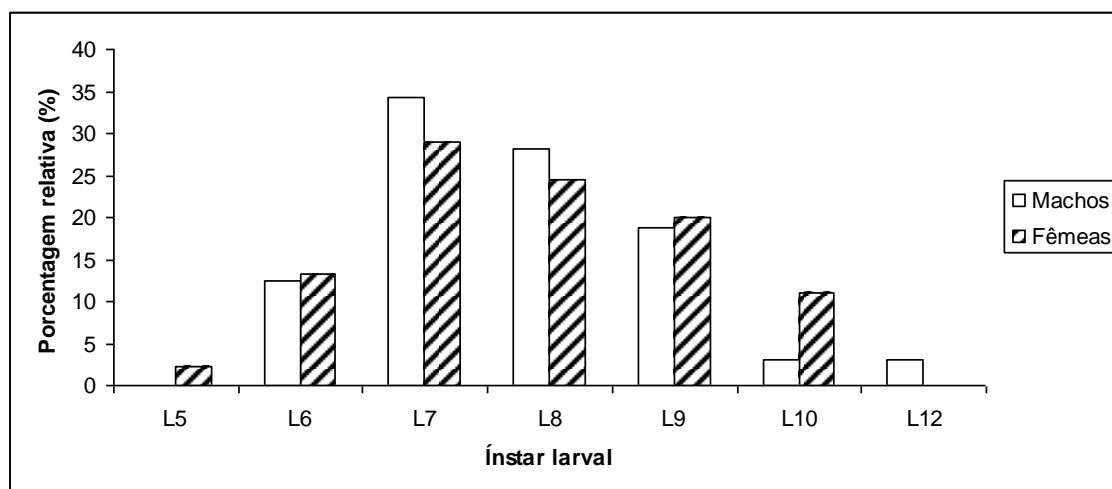


Fig. 5. Porcentagem relativa de indivíduos de *Dermestes maculatus* (machos e fêmeas) que empupam após cada ínstar .

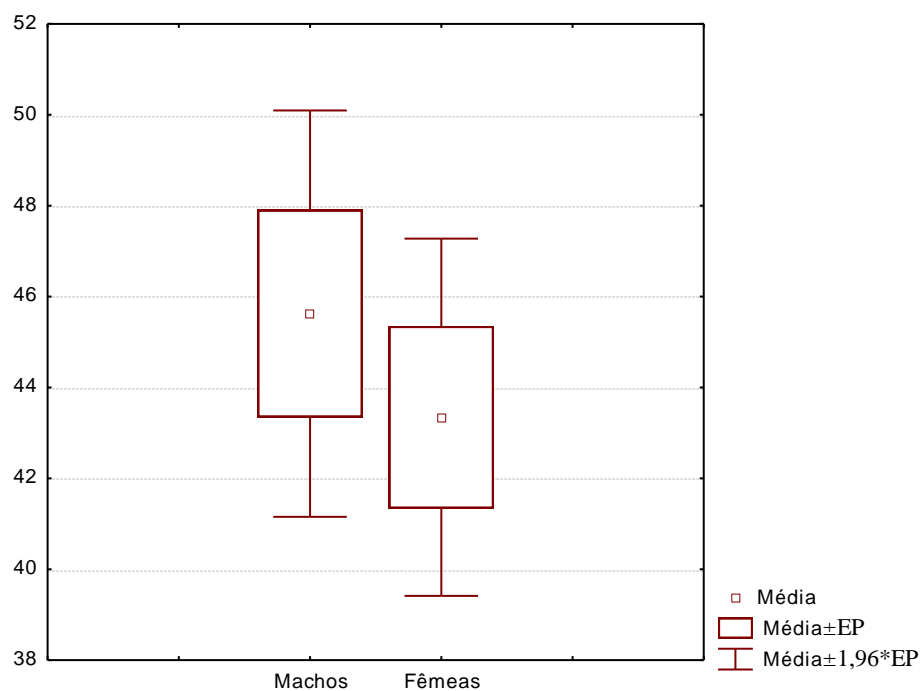


Fig. 6. Média de duração total de desenvolvimento (em dias) de machos e fêmeas de *Dermestes maculatus*, com o erro padrão.

O número variável de ínstaes dificulta a sua utilização na entomologia forense, , já que não há até o momento formas de diferenciar os ínstaes. Dessa forma deve-se analisar o desenvolvimento larval como um todo, o que reduz a acurácia das estimativas

de IPM. Por isso, mais estudos devem ser feitos para encontrar formas mais precisas de diferenciação dos ínstaes larvais antes de sua aplicação como indicador do IPM. No momento, para as estimativas deve-se considerar o tempo para o indivíduo chegar ao quinto ínstar, após o qual o inseto pode empupar para efeitos do cálculo de quando houve a postura.

A pupa apresentou pouca variação na duração. A duração média de ovo a adulto foi de 54,68 dias, sendo o valor mínimo encontrado de 36 dias. Richardson & Goff (2001) descreveram 42 dias como o período mínimo necessário e 59,2 dias como a média para completar o desenvolvimento, quando alimentados com ração de peixe a 25°C. A partir desses resultados sugere-se que as criações feitas com o intuito de calcular o grau dia acumulado utilizem fontes de alimento similares ao objetivo do estudo, já que o alimento pode interferir na duração do ciclo da espécie. Portanto sugere-se que sejam feitos mais estudos utilizando diferentes tecidos animais para estimativas de IPM, já que a maioria dos estudos utilizou como alimento produtos estocados que a espécie pode infestar.

4.6. *Necrobia ruficollis*

Foram observados 19 indivíduos, havendo de 3 e 5 ínstaes. A maioria dos indivíduos empupou após o quarto ínstar, com apenas duas larvas indo até o quinto ínstar. As durações médias em dias, com os desvios padrões foram: $4,10 \pm 0,46$ (ovo); $11,54 \pm 3,01$ (L1); $11 \pm 3,46$ (L2); $19,9 \pm 5,80$ (L3); $24 \pm 11,83$ (L4); $7,5 \pm 3,53$ (L5); $18 \pm 2,34$ (pupa) (Fig. 7). Scott (1919) encontrou uma duração de cerca de 20 dias, contudo em temperatura não controlada em estudo realizado na Inglaterra. O tempo

médio de desenvolvimento de ovo a adulto foi de $84,14 \pm 13,38$ dias, sendo o menor valor encontrado de 65 dias..

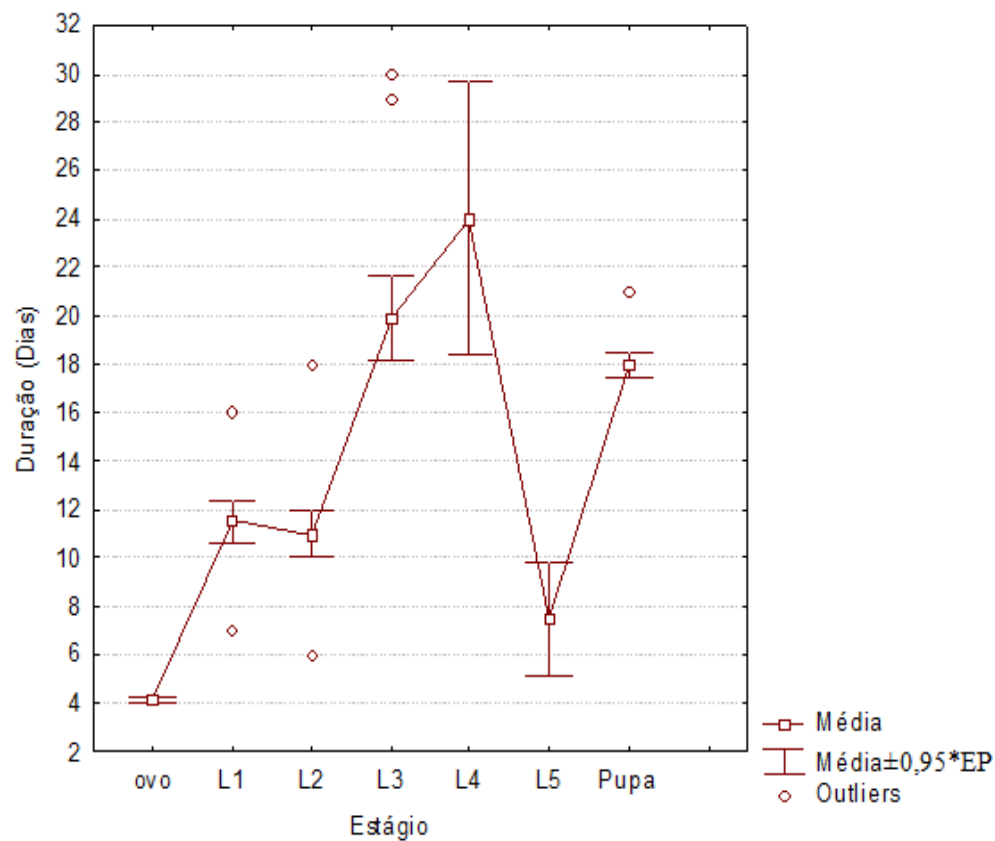


Fig. 7. Duração média em dias de cada estágio de *Necrobia ruficollis*, com o erro padrão e valores extremos (outliers) a 25°C, $\pm 70\%$ de umidade relativa e 12h de fotofase.

4.7. *Necrobia rufipes*

Foram observados 24 indivíduos, sendo encontrado um número variável de instares (3 a 5) assim como *N. ruficollis*. A maioria dos indivíduos empupou após o quarto ínstar, com apenas uma larva chegando até o quinto ínstar. As durações médias

em dias, com os desvios padrões foram: $3,95 \pm 0,70$ (ovo); $9,71 \pm 3,28$ (L1); $10,5 \pm 4,84$ (L2); $11,81 \pm 4,65$ (L3); $16,00 \pm 6,00$ (L4); $20,5 \pm 14,85$ (L5); $18,59 \pm 2,03$ (pupa) (Fig. 8). O tempo médio de desenvolvimento de ovo a adulto foi de $71,81 \pm 17,02$ dias, sendo o menor valor encontrado de 54 dias. Esse valor médio também está acima do encontrado por Simmons & Ellington (1925) em gordura velha de bacon (30 dias), em clima quente. Hasan & Phillips (dados não publicados) conseguiram tempos de desenvolvimento variando de 40 a 45 dias, com a espécie alimentada com larvas de *Tribolium castaneum* (27°C, 65% UR), o que indica que o desenvolvimento pode ser mais curto, caso haja larvas de besouro disponíveis para predação.

Hasan & Phillips (2010) compararam o desenvolvimento da espécie com várias dietas, incluindo produtos armazenados como peixe seco e côco seco. Pode-se concluir que o ciclo varia bastante conforme a alimentação, com alta variação entre indivíduos sob uma mesma dieta.

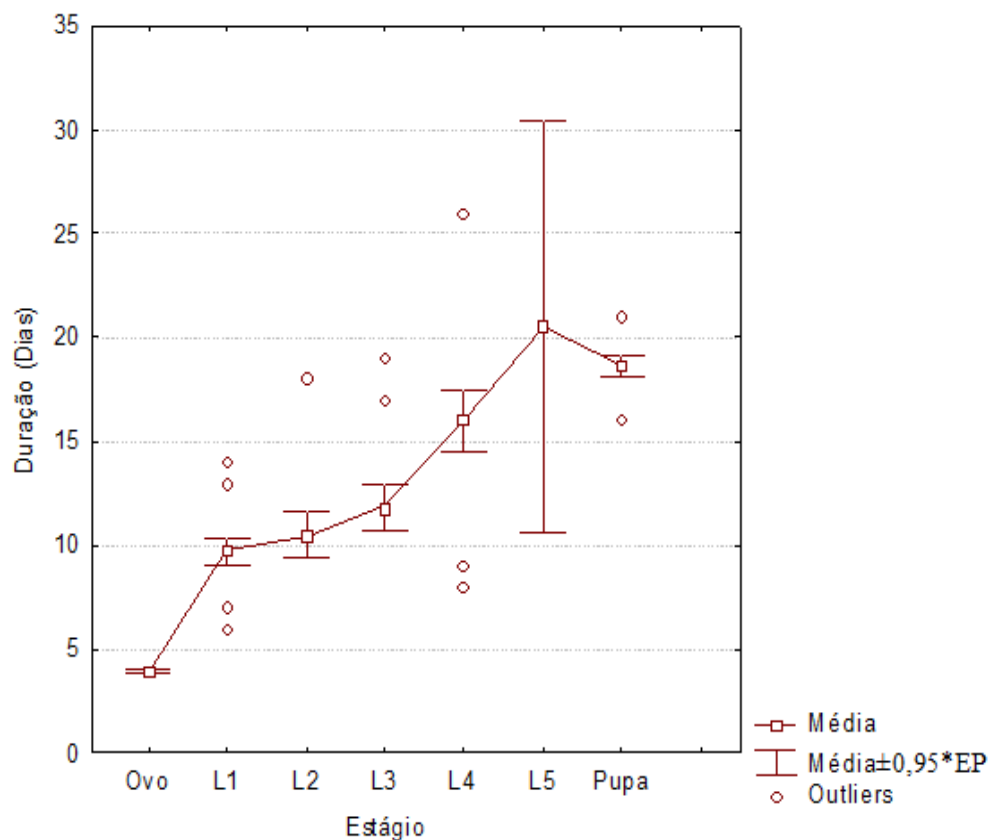


Fig. 8. Duração média em dias de cada estágio de *Necrobia rufipes*, com o erro padrão e valores extremos (outliers) a 25°C, $\pm 70\%$ de umidade relativa e 12h de fotofase.

4.8. Comparação entre as espécies de *Necrobia*

O número de amostras em *Necrobia rufipes* e *N. ruficollis* foi padronizado para ambas as espécies, de modo a possibilitar comparação. Houve diferença significativa entre o 2º e o 4º ínstar larval (Tab. V). Apesar de ambas as espécies serem cosmopolitas, tendo tolerâncias ambientais similares, os resultados mostram que seu ciclo de vida apresenta diferenças.

Tab. V. Valores do teste de Mann-Whitney para comparações entre as fases de desenvolvimento de *Necrobia rufipes* e *Necrobia ruficollis*. Valores significativos estão em negrito.

Fase de desenvolvimento	U	Z	p
Ovo	165,5000	-0,437921	0,661444
L1	48,00000	-0,820813	0,411754
L2	11,00000	-2,20544	0,027424
L3	10,50000	-1,78885	0,073639
L4	1,000000	-2,02073	0,043309
Pupa	19,00000	1,365273	0,172168
Total	14,00000	-1,34164	0,179713

5. Considerações Finais

- As espécies possuem duração similar ao encontrado na literatura, sendo as diferenças provavelmente em razão de diferenças nas populações ou na metodologia de criação e no alimento utilizado, o que ressalta a importância da padronização dos métodos de criação;
- A duração dos estágios de *Oxelytrum erythrurum* foi descrita pela primeira vez;
- As espécies de *Oxelytrum* e *Necrobia* apresentaram diferenças significativas em alguns estágios de seu ciclo, enfatizando a importância da correta identificação e a necessidade de métodos de identificação dos imaturos dessas espécies;
- A duração do ciclo de *Dermestes maculatus* não varia conforme o sexo, apesar de haver um dimorfismo no desenvolvimento;
- Aspectos comportamentais foram descritos pela primeira vez para as espécies de Silphidae, *Oxelytrum discicolle* e *O. erythrurum* para auxiliar no aprimoramento do uso destas espécies como evidência na entomologia forense.

6. Referências

- Amendt, J., C. P. Campobasso; E. Gaudry; C. Reiter; H. N. LeBlanc & M. J. R. Hall
2007. Best practice in forensic entomology - standards and guidelines.
International Journal of Legal Medicine 121: 90-104.
- Archer, M. S. & M. A. Elgar. 1998. Cannibalism and delayed pupation in hide beetles,
Dermestes maculatus DeGeer (Coleoptera: Dermestidae). **Australian Journal
of Entomology 37**: 158-161.
- Bellemare, E. R. & L. Brunelle. 1950. Larval and pupal development of *Dermestes
maculatus* Degeer under controlled conditions of temperature and relative
humidity. **The Canadian Entomologist 82**: 22-24.
- Benecke, M & J. Wells. 2001. DNA techniques for forensic entomology. p. 341-352. *In*:
J. H. Byrd & J. L. Castner (Eds.). **The utility of arthropods in legal
investigations**. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. CRC Press.
418 pp.
- Bornemissza, G. F. 1957. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect
of its decomposition on the soil fauna. **Australian Journal of Zoology 5**: 1-12.
- Caron, E., K. M. Mise & J. Klimaszewski. 2008. *Aleochara pseudochrysorrhoea*, a new
species from southern Brazil (Coleoptera: Staphylinidae: Aleocharinae), with a
complete checklist of Neotropical species of the genus. **Revista Brasileira de
Zoologia 25**: 827-842.
- Carvalho, L. M. L.; P. J. Thyssen; M. L. Goff & A. X. Linhares. 2004. Observations on
the succession patterns of necrophagous insects on a pig carcass in an urban area
of southeastern Brazil. **Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine
and Toxicology 5**: 33-39.

- Cornaby, B.W. 1974. Carrion reduction by animals in contrasting tropical habitats. **Biotropica** **6**: 51-63.
- Haberer, W.; T. Schmitt; K. Peschke; P. Schreier & J. K. Müller. 2008. Ethyl 4-methyl heptanoate: A male-produced pheromone of *Nicrophorus vespilloides*. **Journal of Chemical Ecology** **34**: 94-98.
- Hanski, I. 1987. Nutritional ecology of dung- and carrion-feeding insects. p. 837-884. *In*: F. Slansky & F. G. Rodriguez (Eds.). **Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates**. John Wiley & Sons, New York. 1032 p.
- Hasan, M. M. & T. W. Phillips. 2010. Mass-rearing of the redlegged ham beetle, *Necrobia rufipes* De Geer (Coleoptera: Cleridae) for laboratory research. **Journal of Stored Products Research** **46**: 38-42.
- Jacob, T. A. & D. A. Fleming. 1985. The effect of constant temperature and humidity on the egg period of *Dermestes maculatus* DeGeer and the influence of free water upon the developmental period (Col. Dermestidae). **Entomologist's Monthly Magazine** **121**:19-23.
- Keh, B. 1985. Scope and applications of forensic entomology. **Annual Review of Entomology** **30**: 137-154.
- Midgley, J. M.; C. S. Richards & M. H. Villet. 2010. The utility of Coleoptera in Forensic Investigations. p. 57-68. *In*: J. Amendt; C. P. Campobasso; M. L. Goff & M. Grassberger (Eds.). **Current Concepts in Forensic Entomology**. Dordrecht, Heidelberg, London, New York. Springer. 376 pp.
- Mise, K. M.; L. M. Almeida & M. O. Moura. 2007. Levantamento da fauna de Coleoptera que habita a carcaça de *Sus scrofa* L., em Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Entomologia** **51**: 358-368.

- Moretti, T.C.; O. B. Ribeiro; P. J. Thyssen & D. R. Solis. 2008. Insects on decomposing carcasses of small rodents in a secondary forest in Southeastern Brazil. **European Journal of Entomology** **105**: 691-696.
- Osuji, F. N. 1975. Some aspects of the biology of *Dermestes maculatus* DeGeer (Coleoptera, Dermestidae) in dried fish. **Journal of Stored Products Research** **11**: 25-31.
- Parra, J. R. P. & M. L. Haddad. 1989. **Determinação do número de ínstares de insetos**. Piracicaba, Brasil. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ). 49 p.
- Poutsma, J.; A. J. M. Loomans; B. Aukema & T. Heijerman. 2008: Predicting the potential geographical distribution of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, using the CLIMEX model. **Biocontrol** **53**: 103-125.
- Quinn, G. P. & M. J. Keough. 2002. **Experimental design and data analysis for biologists**. New York, USA. Cambridge University Press. 537 p.
- Raspi, A. & R. Antonelli. 1995. Influence of constant temperature on the development of *Dermestes maculatus* Deg. (Coleoptera Dermestidae). **Frustula entomologica** **18**: 169-176.
- Richardson, M. S. & M. L. Goff. 2001. Effects of temperature and intraspecific interaction on the development of *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae). **Journal of Medical Entomology** **38**(3): 347-351.
- Roach B.; T. Eisner & J. Meinwald. 1990. Defense mechanisms of arthropods. 83. α - and β -necrodol, novel terpenes from a carrion beetle (*Necrodes surinamensis*, Silphidae, Coleoptera). **Journal of Organic Chemistry** **55**(13): 4047-4051.
- Roe, R. M.; A. M. Hammond Jr. & T. C. Sparks. 1982. Growth of larval *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) on an artificial diet and synchronization of

- the last larval stadium. **Annals of the Entomological Society of America** **75**(4): 421-429.
- Scoggin, J. K. & O. E. Tauber. 1951. The bionomics of *Dermestes maculatus* Deg. II. larval and pupal development at different moisture, levels and on various media. **Annals of the Entomological Society of America** **44**: 544-550.
- Scott, H. 1919. Notes on the biology of *Necrobia ruficollis*, Fabr. (Coleoptera, Cleridae). **Annals of Applied Biology** **6**(2): 101-115.
- Simmons, P. & G. W. Ellington. 1925. The ham beetle, *Necrobia rufipes* DeGeer. **Journal of Agricultural Research** **30**: 845-863.
- Velásquez, Y. & A. L. Vilorio. 2009. Effects of temperature on the development of the Neotropical carrion beetle *Oxelytrum discicollis* (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae). **Forensic Science International** **185**: 107-109.

Capítulo II

Variação ontogenética e interespecífica em espécies de Coleoptera de interesse forense baseada em hidrocarbonetos cuticulares

Resumo

A identificação adequada é o primeiro passo na utilização da evidência entomológica em uma investigação legal. Contudo ela pode ser difícil quando os exemplares estão danificados ou quando somente os imaturos são coletados. Dessa forma, técnicas devem ser desenvolvidas para superar dificuldades associadas à identificação por caracteres morfológicos. Por isso, esse estudo objetivou utilizar os hidrocarbonetos da cutícula das seguintes espécies de Coleoptera, *Dermestes maculatus*, *Necrobia rufipes*, *Necrobia ruficollis*, *Oxelytrum discicolle* e *O. erythrurum*, como marcadores para identificação intra e interespecíficas. As extrações foram feitas com hexano e SPME e os extratos foram analisados por CG e CG-MS. As espécies de *Oxelytrum* puderam ser diferenciadas, sendo os compostos tricosano, pentacosano e uma terceira molécula ainda não identificada, responsáveis por essa diferenciação. Não foi possível diferenciar qualitativamente os ínstaros de *Oxelytrum discicolle*, mas *O. erythrurum* pôde ser diferenciada quantitativamente. Não foi possível diferenciar as espécies de *Necrobia* com esta metodologia. *Dermestes maculatus* apresentou um número muito grande de ínstaros e seu tamanho impossibilitou a análise, mas há fortes indícios de que a metodologia é adequada. Assim, os hidrocarbonetos de cutícula podem servir como uma ferramenta complementar a morfologia na identificação de espécies de Coleoptera de interesse forense.

Abstract

The correct identification is the first step in using the entomological evidence in any legal investigation. However such procedure may be complicated when specimens are damaged or when only immatures are collected. Therefore, techniques must be developed to overcome difficulties associated with identifications by morphological characters. This study sought to document the cuticular hydrocarbons of the following species of Coleoptera, *Dermestes maculatus*, *Necrobia rufipes*, *Necrobia ruficollis*, *Oxelytrum discicolle* and *O. erythrurum*, for intra and interspecific comparisons. The extractions were made using hexane and SPME, being analyzed by GC and GC-MS. The species of *Oxelytrum* could be differentiated by the compounds tricosane, pentacosane and a third molecule yet to be identified. It was not possible to differentiate qualitatively the instars of *Oxelytrum discicolle*, but *O. erythrurum* shows strong evidences that such differentiation could be done quantitatively. It was not possible to differentiate species of *Necrobia* with this methodology. *Dermestes maculatus* had a very high number of instars and their size made it impossible to analyse the species, but there is evidence that the methodology is adequate. Therefore cuticular hydrocarbons may serve as a complementary tool to morphological identification of Coleoptera species of forensic importance.

1. Introdução

Há vários insetos que utilizam carcaças e fazem parte dos principais grupos de organismos decompositores. Entretanto, a relevância desse processo tem ultrapassado a sua participação na ciclagem de nutrientes (Cornaby 1974; Hanski 1986). Esse período de tempo em que os insetos vivem na carcaça do animal pode ser utilizado para determinar em quais circunstâncias a morte ocorreu e ainda estimar o intervalo pós-morte (IPM) (Keh 1985; Catts & Goff 1992) no contexto da Entomologia Forense. Tais estimativas podem ser baseadas na biologia ou na composição da comunidade de insetos encontrados em cadáveres. Contudo, antes de se utilizar a evidência entomológica em uma investigação legal, é fundamental a identificação adequada das espécies, pois pode haver variações nos períodos de colonização, duração do período de ovo e taxa de crescimento larval (Benecke & Wells 2001).

Harvey *et al.* (2003) citam que a correta identificação pode ser difícil usando metodologias baseadas em morfologia. Isso se deve a vários fatores, os quais incluem: a diversidade das espécies, o estágio de vida em que o indivíduo foi coletado e a coleta apenas de insetos mortos. Outra dificuldade é que frequentemente são coletados os imaturos e sua diagnose é difícil, principalmente pela ausência de chaves de identificação de espécies. Para uma identificação precisa é necessária a criação dos imaturos até o estágio adulto, um processo que requer um tempo maior.

Otranto & Stevens (2002), salientam que nas condições longe das ideais da cena do crime, larvas e ovos de vários dípteros de importância forense são difíceis de distinguir, pois suas diferenças morfológicas podem estar mal preservadas.

Os mesmos problemas se mantêm em relação aos besouros. Coleoptera é uma das ordens de maior interesse forense, com vários representantes necrófagos. Quando

corpos humanos em estágio avançado de decomposição são recuperados, os Coleoptera são a principal evidência entomológica na determinação do IPM, baseada principalmente no padrão de sucessão (Kulshrestha & Satpathy 2001). Os Coleoptera necrófagos ocorrem em estágios mais avançados de decomposição, porém os predadores chegam antes que as larvas de dípteros tenham abandonado os restos. Goff (1991) citou que a ordem aumenta, em comparação com ambientes fechados, tanto em número de indivíduos quanto em número de espécies durante estágios avançados de decomposição de restos em ambiente aberto.

Assim, técnicas mais apropriadas devem ser desenvolvidas para superar dificuldades associadas à identificação apenas por meio de caracteres morfológicos, principalmente para aumentar a acurácia. Estas técnicas também necessitam fornecer uma identificação rápida, que é crucial para uma bem-sucedida conclusão de um caso (Sperling *et al.* 1994).

O estudo dos hidrocarbonetos cuticulares parece uma maneira promissora para a diferenciação das espécies. Isto porque a epicutícula dos insetos é coberta por uma camada de lipídios cuticulares espécie-específicos. Estes lipídios são frequentemente compostos por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, os quais em algumas espécies constituem mais de 90% dos lipídios cuticulares (Page *et al.* 1990). O processo evolutivo dos insetos fez com que os hidrocarbonetos desempenhassem várias funções, servindo principalmente como camada cuticular à prova d'água e na comunicação química (Blomquist 2010). Hidrocarbonetos cuticulares de insetos são normalmente compostos de n-alcanos, alcenos, monometil alcanos e polimetil alcanos terminalmente e internamente ramificados (Howard & Blomquist 2005).

Os n-alcanos normalmente têm comprimentos de cadeia variando entre 21 a 31 ou 33 carbonos. Hidrocarbonos com menos de 20 carbonos ocorrem normalmente como

feromônios, compostos defensivos, ou compostos intermediários na biosíntese de ambos. Isso ocorre, pois quanto menor a cadeia, mais voláteis eles são, fazendo com que sejam inadequados como componentes cuticulares. Os n-alcenos têm sido encontrados em quase todas as espécies de insetos analisadas, e podem compreender desde uma pequena parte dos hidrocarbonetos totais a quase toda a fração (Blomquist 2010).

Os alcanos são caracterizados na espectrometria de massa por possuir uma alta intensidade de íons com massa/carga (m/z) 41, 55 e 71, e intensidade decrescente de íons nas séries 85, 99, 113. Já os alcenos apresentam valores altos de m/z em 53, 69, 83 e 97, seguidos por um decréscimo de m/z depois de 111, 125, 139, etc. Os monometil alcanos têm um padrão similar aos alcanos, apresentam, no entanto, uma interrupção no centro do espectro de massa, caso o grupo metil esteja localizado aproximadamente no meio do alcano. Nos polimetil alcanos ao invés de um par de íons, ocorrem 4 ou mais pares (conforme o tamanho da cadeia aumenta) (Drijfhout 2010).

A composição química dos metabólitos da cutícula pode ser usada como marcador evolutivo, pois tais compostos variam em quantidade relativa entre espécies de insetos (Page *et al.* 1990, 2002), contudo são mais similares dentro de um gênero do que entre gêneros. Em Coleoptera, o padrão de hidrocarbonetos varia com a família e pode portanto ser usado na taxonomia (Jacob 1979). Contudo atualmente as pesquisas sobre a utilização de hidrocarbonetos cuticulares como marcadores quimiotaxonômicos em besouros se concentraram em Tenebrionidae (Lockey 1978) e Scolytidae (Page *et al.* 1990).

Goodrich (1970) examinou lipídios cuticulares de pupários e adultos de *Lucilia cuprina* Wiedemann e encontrou diferenças significativas tanto quantitativa quanto qualitativamente entre estes dois estágios. Zhu *et al.* (2006) encontraram mudanças significativas nos hidrocarbonetos da cutícula em diferentes idades larvais de

Chrysomya rufifacies Macquart. Isso se deve aos hidrocarbonetos permanecerem na exúvia dos imaturos, tendo o inseto que sintetizar um novo conjunto.

Essas características fazem dos hidrocarbonetos uma ferramenta para dar maior rapidez na determinação da idade e identificação dos insetos de importância forense, tendo em vista a dificuldade da separação, principalmente de imaturos, por caracteres morfológicos. Para tal fim, é necessário conhecer antes a variação interespecífica e intraespecífica na configuração dos hidrocarbonetos.

Tendo em vista que as espécies de Coleoptera de interesse forense têm sido pouco estudadas apesar de serem conhecidamente associadas a carcaças, este estudo tem como objetivo a investigação de novas técnicas para facilitar a identificação tanto dos imaturos quanto dos adultos, além da separação dos estágios imaturos de cada uma das espécies, para uso na determinação do IPM.

Para analisar a efetividade dos hidrocarbonetos de cutícula na identificação de espécies de interesse forense, foram selecionadas as espécies *Dermestes maculatus*, *Necrobia rufipes*, *Necrobia ruficollis*, *Oxelytrum discicolle* e *Oxelytrum erythrurum*. A escolha destas espécies se deu com base em sua abundância em estudos de sucessão da fauna cadavérica, assim como pelo seu potencial forense (Mise et al. 2007).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Caracterizar os hidrocarbonetos cuticulares de *Dermestes maculatus* DeGeer, 1774, *Necrobia rufipes* (DeGeer, 1775), *Necrobia ruficollis* (Fabricius, 1775), *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840), *Oxelytrum Erythrurum* (Blanchard, 1840), com importância para comparações intra e interespecíficas.

2.2. Objetivos Específicos

- Descrever os hidrocarbonetos cuticulares de importância na diferenciação intra e interespecífica dos imaturos das espécies *Dermestes maculatus*, *Necrobia rufipes*, *N. ruficollis*, *Oxelytrum discicolle*, *O. erythrurum*.
- Diferenciar intraespecificamente os ínstares larvais e pupa de *D. maculatus*, *N. rufipes*, *N. ruficollis*, *O. discicolle*, *O. erythrurum*, tanto qualitativamente quanto quantitativamente.
- Verificar a viabilidade da análise qualitativa de hidrocarbonetos cuticulares na diferenciação de ínstares larvais e pupa de *N. rufipes* e *N. ruficollis*.
- Verificar a viabilidade da análise qualitativa de hidrocarbonetos cuticulares na diferenciação de ínstares larvais e pupa de *O. discicolle* e *O. erythrurum*.

3. Metodologia

Para a análise dos hidrocarbonetos da cutícula foram utilizados exemplares vivos de cada estágio imaturo de *Necrobia rufipes*, *Necrobia ruficollis*, *Dermestes maculatus*, *Oxelytrum erythrurum* e *Oxelytrum discicolle*.

Tab. VI. Quantidade de exemplares por ínstar de cada espécie utilizados na análise dos hidrocarbonetos de cutícula. Entre parênteses o número de repetições realizadas.

Estádio	<i>O. discicolle</i>	<i>O. erythrurum</i>	<i>N. rufipes</i>	<i>N. ruficollis</i>	<i>D. maculatus</i>
1º ínstar	5 (2x)	5 (2x)	30 (1x)	30 (1x)	30 (2x)
2º ínstar	2 (5x)	2 (5x)			
3º ínstar	1 (18x)	1 (6x)			

Os hidrocarbonetos cuticulares foram extraídos pela imersão dos espécimes de cada ínstar (Tab. VI) em tubos de vidro contendo hexano redistilado de modo a cobrir os exemplares (100µL, 200µL ou 300µL), a temperatura ambiente por 20 minutos. O solvente foi transferido com o auxílio de uma micropipeta para um novo frasco de vidro, sendo adicionado 10µL do padrão interno (tridecano) a 10 ppm, quando comparações quantitativas eram necessárias. O extrato foi então concentrado com fluxo de argônio 30µL (*D. maculatus* e *Necrobia* spp.) e 20µL (*Oxelytrum* spp.), sendo armazenados em freezer a -20° C.

Os extratos de ambos os métodos de extração foram injetados no cromatógrafo gasoso (GC 2010 Shimadzu) para verificar sua concentração. Posteriormente, foram injetados em um cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas, (GCMS-QP2010 Shimadzu), equipado com detector quadrupólo e operado no modo “splitless”. Uma coluna capilar DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm) foi utilizada sob as seguintes condições: temperatura inicial de 50°C por 1 minuto com um aumento de 7°C/minuto até a temperatura final de 250°C, sob a qual foi mantida por 10 minutos. Após o término, os cromatogramas foram analisados e feitas repetições até se encontrar um

padrão nos perfis. Os perfis foram então comparados entre eles para detectar diferenças entre os compostos químicos liberados pelos diferentes ínstares das espécies e entre espécies. Os compostos que diferiram qualitativamente ou quantitativamente entre espécies foram analisados quanto ao padrão de fragmentação das moléculas para verificar se correspondiam a hidrocarbonetos. Esses hidrocarbonetos tiveram o índice de Kovats (KI) calculado e comparado com compostos já descritos na literatura.

Para as análises realizadas com a “solid phase microextraction” (SPME), a fibra foi passada várias vezes sobre toda a superfície dorsal do inseto, durante o período. Esse processo foi repetido após a injeção no cromatógrafo gasoso, para injeção no CG-MS.

4. Resultados e Discussão

4.1. Silphidae

Dentro de *O. discicolle*, não houve diferença qualitativa entre os ínstares larvais quanto aos cinco hidrocarbonetos principais (Fig. 9). Steiger *et al.* (2008) registraram que adultos de *Nicrophorus vespilloides* (Silphidae) apresentam uma mistura compreendida basicamente por n-alcanos, alcenos e metil-alcanos, com cadeias variando de C₁₈ a C₃₁. Tal faixa poderia englobar os compostos encontrados para as espécies *Oxelytrum discicolle* e *O. erythrurum*, pois a composição dos hidrocarbonetos cuticulares de larvas podem ser iguais a dos adultos (Hebanowska *et al.* 1990).

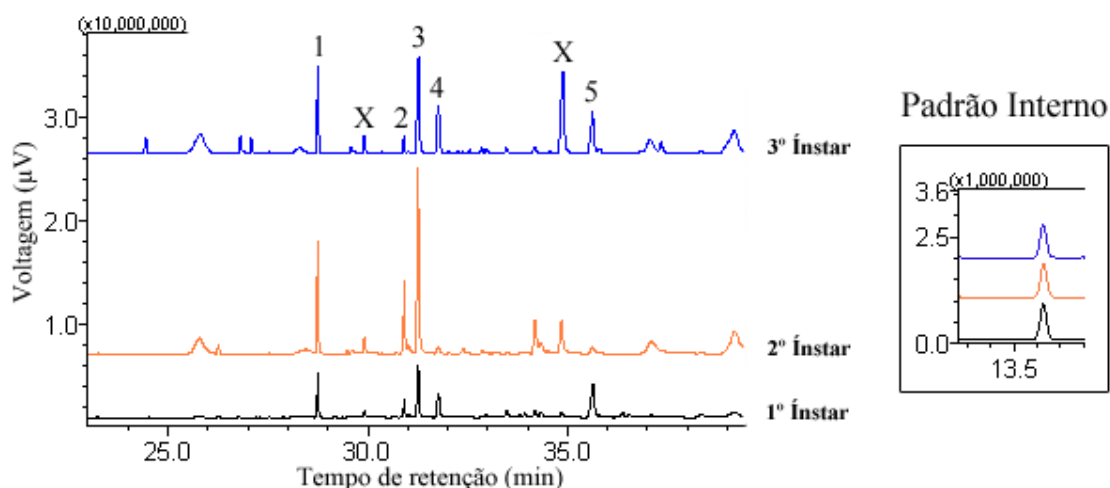


Fig. 9. Análises cromatográficas obtidas a partir dos ínstarres larvais de *Oxelytrum discicolle* usando extração em hexano. Os números indicam os picos pertencentes aos hidrocarbonetos e o “X”, contaminantes.

Zhu *et al.* (2006) observaram que em *Chrysomya rufifacies*, os perfis de hidrocarbonos cuticulares mudaram significativamente com a idade, com o decréscimo gradual dos hidrocarbonos de cadeia curta. Tais padrões não puderam ser observados no experimento quando se comparou os ínstarres larvais. Com o decréscimo no número de indivíduos utilizados a cada ínstar, seria esperada a redução dos picos dos hidrocarbonetos de cadeia curta, o que não ocorreu. Houve um aumento dos hidrocarbonetos de cadeia mais curta, picos 1, 2 e 3, com redução dos de cadeia mais longa, picos 4 – KI 2525 (Fig. 10) e 5 - KI 2721 (Fig. 11), ambas as moléculas ainda não descritas, sendo fornecido seus espectros de massa. Embora a maioria dos extratos de segundo ínstar tenha um perfil cromatográfico como o ilustrado, houve variação entre indivíduos na concentração das moléculas KI 2525 e KI 2721. No terceiro ínstar ocorreu o contrário, os hidrocarbonetos de cadeia curta diminuíram e os de cadeia mais longa aumentaram. O segundo ínstar poderia ser facilmente diferenciado dos demais

pelo perfil cromatográfico discordante, contudo como foi encontrada uma variação entre indivíduos, a diferenciação quantitativa dos ínstaes de *O. discicolle* não é recomendada.

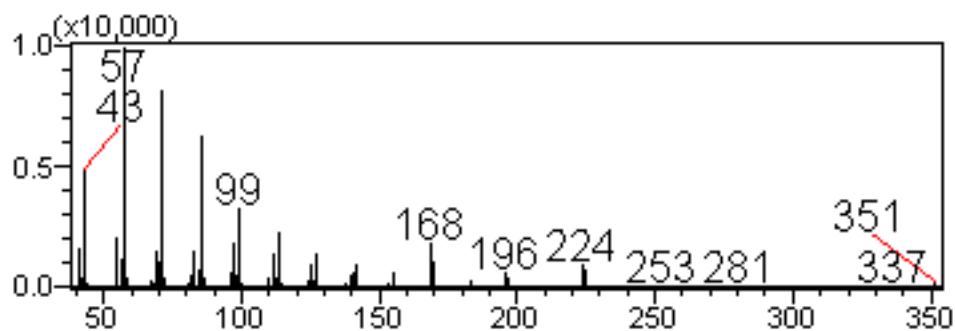


Fig. 10. Espectro de massa do composto com índice de kovats de 2525.

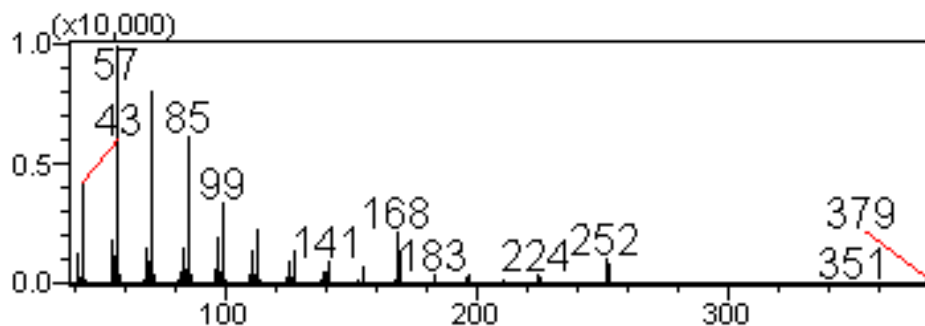


Fig. 11. Espectro de massa do composto com índice de kovats de 2721.

Durante as injeções com extratos de terceiro ínstar pôde-se notar que larvas prestes a empupar tinham concentração reduzida ou até mesmo nenhum hidrocarboneto. Quando comparado os resultados de extrações feitas com a SPME (Fig. 12), a pupa não apresenta hidrocarbonetos. A larva de terceiro ínstar provavelmente cessa a produção dos hidrocarbonetos quando está próxima à fase de pré-pupa. Isso ocorre provavelmente em função de que a pupa não precisa impermeabilizar a epicutícula já que a mesma está protegida dentro de um aglomerado de terra, que teria ação impermeabilizante.

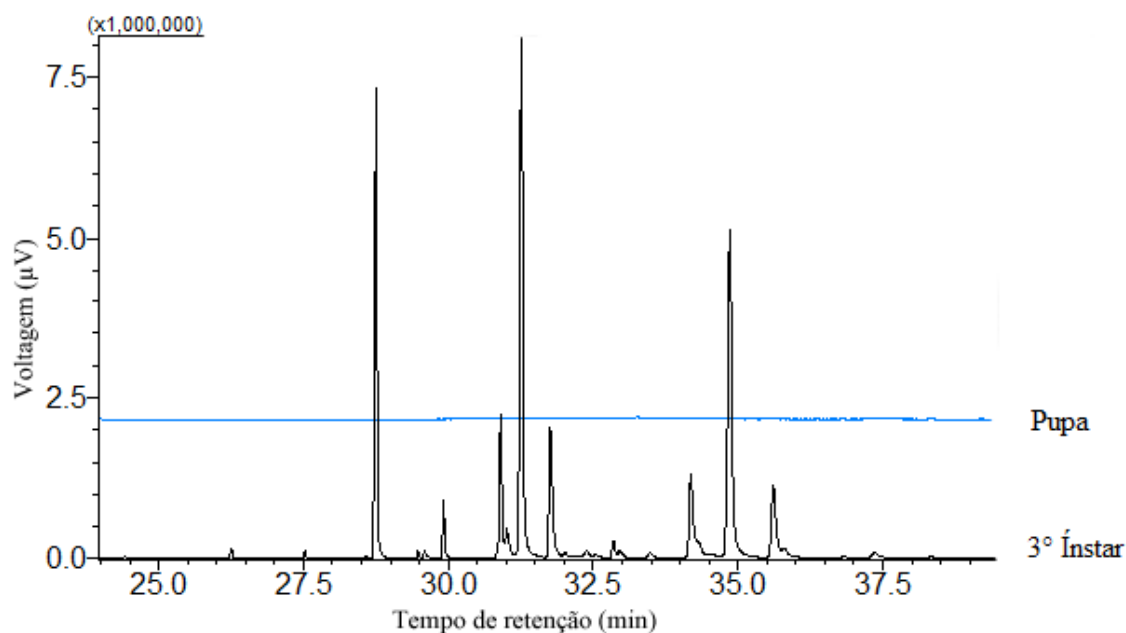


Fig. 12. Análises cromatográficas obtidas a partir do terceiro ínstar e pupa de *Oxelytrum discicolle* usando extração pela SPME.

Já em *O. erythrurum*, apesar de não haver variação qualitativa nos picos, os hidrocarbonetos variam quantitativamente (Fig. 13). Os picos 1 (KI 2303 – similar ao valor do tricosano) e 3 (KI 2635 – Fig. 14) representam compostos característicos do primeiro ínstar, já que ocorrem em reduzida quantidade ou até mesmo não são detectáveis nos demais ínstaes. O segundo e terceiro ínstar são caracterizados pelo aumento na quantidade do composto 4 (KI 2688 – Fig. 15). Esses dados corroboram os resultados de Zhu *et al.* (2006), que encontrou uma redução, conforme a idade, dos hidrocarbonetos de cadeia curta em relação ao composto de cadeia mais longa, no caso o n-C29.

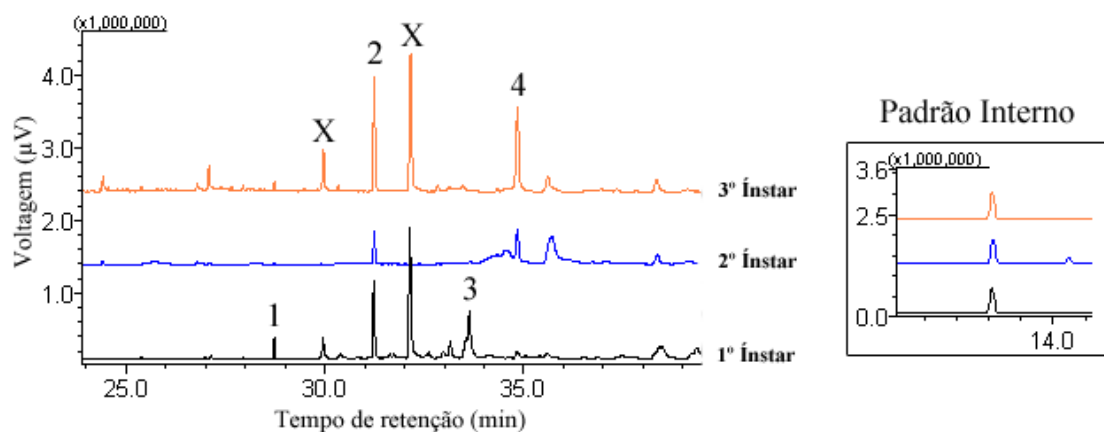


Fig. 13. Análises cromatográficas obtidas a partir dos ínstaes larvais de *Oxelytrum erythrurum* usando extração em hexano. Os números indicam os picos pertencentes aos hidrocarbonetos e o “X”, contaminantes

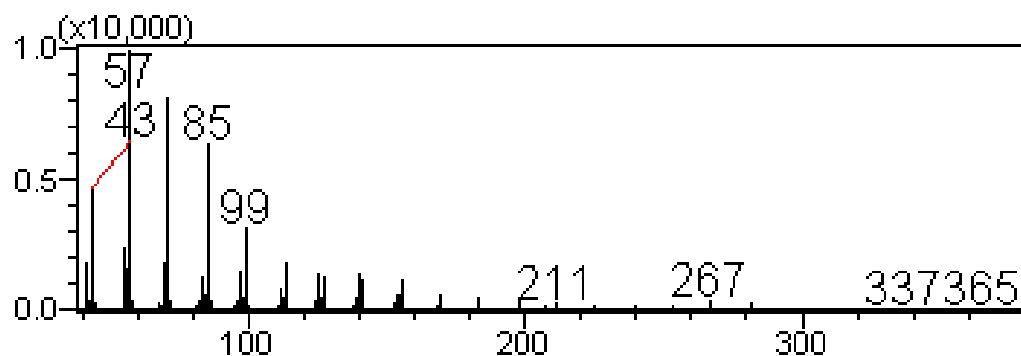


Fig. 14. Espectro de massa do composto com índice de kovats de 2635.

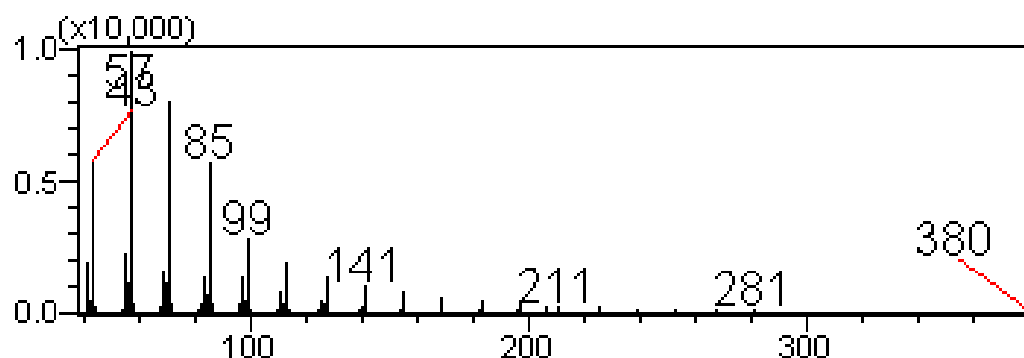


Fig. 15. Espectro de massa do composto com índice de kovats de 2688.

No 1º ínstar (Fig. 16) pode-se notar que os picos 2 e 4 estão presentes somente em *Oxelytrum discicolle*. O pico 2 tem índice de Kovats 2470, correspondendo, sob a metodologia utilizada, provavelmente ao pentacosano. Já o pico 4, (KI 2525 – Fig. 10) não correspondendo a nenhum composto conhecido.

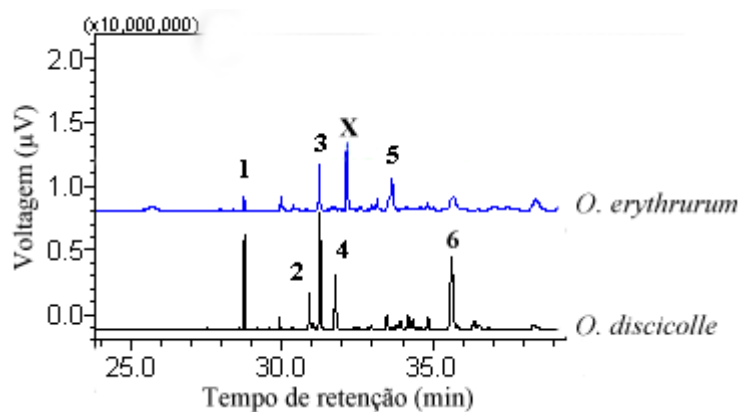


Fig. 16. Análise cromatográfica do 1º ínstar larval de *Oxelytrum discicolle* e *Oxelytrum erythrurum* com extração por hexano. Os números ilustram os picos pertencentes a hidrocarbonetos e o “X”, contaminantes.

Já no 2º ínstar, a proporção do KI 2525 cai, sendo a diferença mais evidente entre os picos 1 (provavelmente tricosano), e o 2 (provavelmente pentacosano) (Fig. 17).

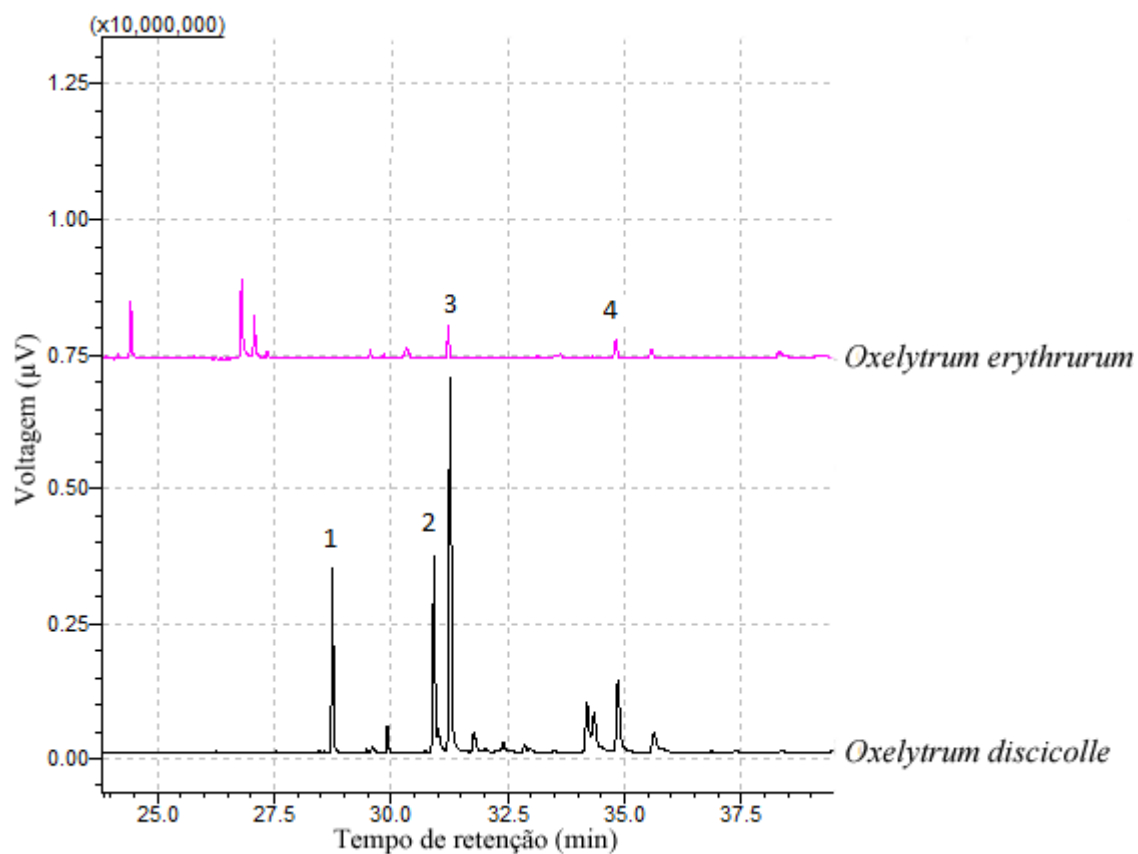


Fig. 17. Análise cromatográfica do 2º ínstar larval de *Oxelytrum discicolle* e *Oxelytrum erythrurum* com extração por hexano. Os números ilustram os picos pertencentes a hidrocarbonetos.

No 3º ínstar as espécies diferem qualitativamente pelo pico 4 (KI 2525 – Fig. 10). Quantitativamente, o pico 1 (provavelmente tricosano) está presente em quantidade muito maior em *O. discicolle*, sendo um dos compostos majoritários (Fig. 18).

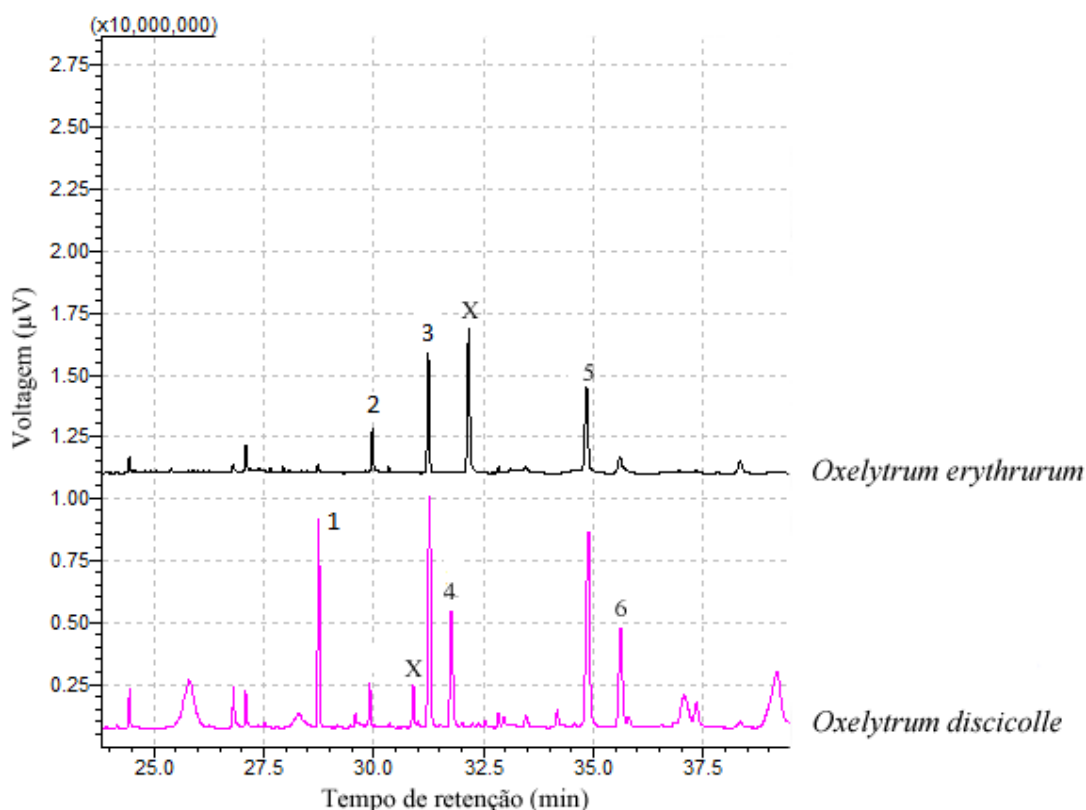


Fig. 18. Análise cromatográfica do 3º ínstar larval de *Oxelytrum discicolle* e *Oxelytrum erythrurum* com extração por hexano. Os números ilustram os picos pertencentes a hidrocarbonetos e o “X”, contaminantes.

Os principais compostos com KI similar a moléculas identificadas foram o tricosano e o pentacosano. Dentre os vaga-lumes japoneses, o tricosano foi observado em *Luciola lateralis* e *L. cruciata* (Lampyridae) (Shibue *et al.* 2004). O tricosano pode, além de compor a cutícula, atuar como feromônio, em Coleoptera é encontrado em: *Chrysochus cobaltinus* (Chrysomelidae); *Adalia bipunctata* e *Coccinella septempunctata* (Coccinellidae); *Diaprepes abbreviatus* (Curculionidae); *Attagenus unicolor* (Dermestidae); *Pyrocoelia oshimana* (Lampyridae) (El-Sayed 2008). O pentacosano é registrado como feromônio em todas as espécies de Coleoptera em que foram encontrados o tricosano, a exceção de *P. oshimana*. Além delas, ocorrem em *Diaritiger*

fossulatus (Pselaphinae), *Xylotrechus colonus* (Cerambycidae); *Antitrogus consanguineus* (Scarabaeidae); *Zyras comes* (Staphylinidae); *Renatiella scrobipennis*, *Zophosis moralesi* e *Z. orbicularis* (Tenebrionidae), também atuando como feromônios (El-Sayed 2008). O pentacosano é um indicador de fertilidade e é muito provavelmente usado por operárias para identificar e policiar os membros da colônia que ativam os ovários na presença da rainha em *Aphaenogaster cockerelli* (Formicidae) (Smith *et al.* 2009).

4.2. Cleridae

A metodologia utilizada falhou na extração dos hidrocarbonetos em *Necrobia rufipes* e *Necrobia ruficollis*. A extração por hexano capturou muitos contaminantes, provavelmente em razão do hábito das espécies que vivem em contato direto com o seu alimento (bacon), sendo que os perfis foram semelhantes quando comparadas as espécies (Fig. 19). A SPME não capturou hidrocarbonetos, pois para evitar a captura de compostos do bacon, o tempo de extração foi reduzido (Fig. 20).

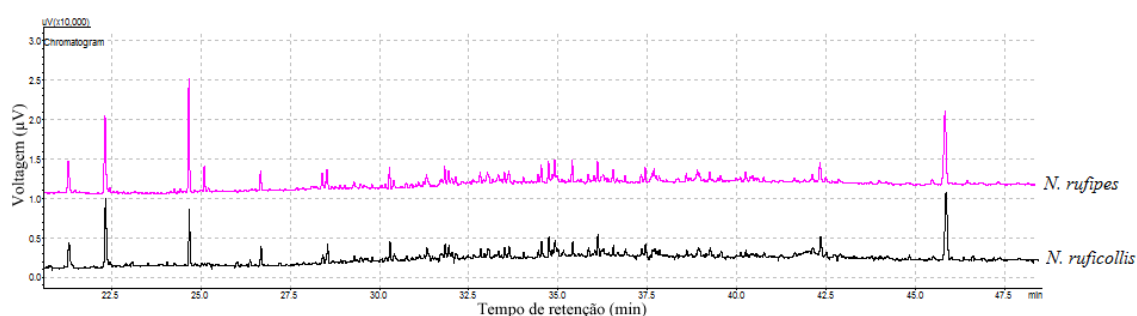


Fig. 19. Análise cromatográfica de *Necrobia rufipes* e *Necrobia ruficollis*, por extração em hexano.

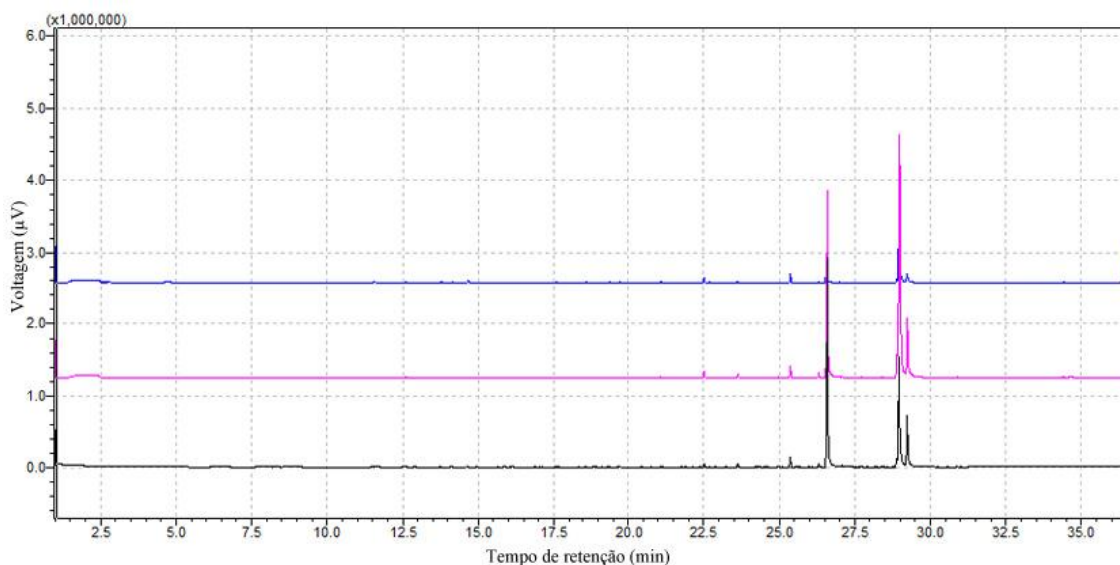


Fig. 20. Análise cromatográfica de larvas do terceiro ínstar de *Necrobia rufipes*, por 5 minutos de extração com SPME.

4.3. *Dermestes maculatus*

Apenas as extrações do primeiro ínstar foram realizadas, pois seria exigido um número maior de exemplares do que o previamente imaginado, o que gerou dificuldades metodológicas. Dentre as razões estão principalmente o ciclo de vida longo e o número variável de instares (5-12), o que torna difícil sincronizar a criação para ter o número de larvas necessário no mesmo dia.

O primeiro ínstar parece apresentar 6 hidrocarbonetos, contudo mais repetições devem ser feitas já que houve variação entre as repetições (Fig. 21). Diferentemente das espécies de *Necrobia*, a metodologia parece apropriada, contudo exigiria um número de exemplares que não pôde ser atingido com a criação.

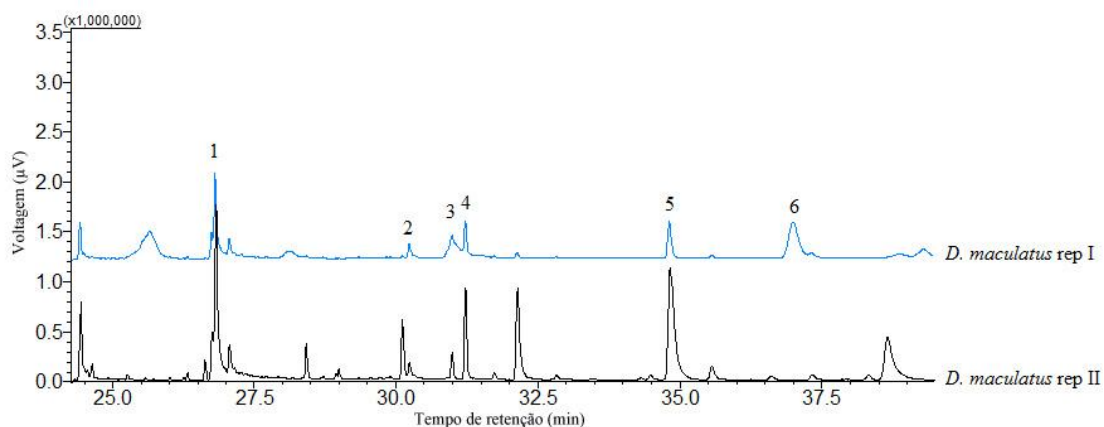


Fig. 21. Análise cromatográfica das extrações em hexano de 30 larvas do primeiro ínstar de *Dermestes maculatus*.

5. Considerações Finais

- Foi possível através do presente estudo diferenciar as espécies *Oxelytrum discicolle* de *O. erythrurum* com base nos hidrocarbonetos de cutícula, sendo que essas moléculas tiveram seu índice de Kovats descrito.
- O mesmo não pôde ser feito para as duas espécies de *Necrobia* em virtude da metodologia utilizada não ser adequada. Para que se torne possível, é preciso desenvolver metodologias mais apropriadas para limpeza do material antes da extração.
- As diferenças nos perfis de hidrocarbonetos cuticulares dentro das duas espécies de *Oxelytrum* não foram qualitativas, contudo há uma diferenciação quantitativa nos instares de *O. erythrurum*. Já em *O. discicolle*, apesar de haver uma variação quantitativa, não é recomendado fazer a separação dos instares dessa forma, por haver variação na concentração das moléculas responsáveis por essa diferença.

- A metodologia para extração de *Dermestes maculatus* aparentemente é adequada, mas os métodos de criação devem ser aprimorados para viabilizar tais testes.

6. Referências

- Benecke, M & J. Wells. 2001. DNA techniques for forensic entomology. *In*: BYRD, J. H. & CASTNER, J. L. (Eds). **The utility of arthropods in legal investigations**. CRC Press Boca Raton London. New York, Washington, D.C.
- Blomquist, G.J. 2010. Structure and analysis of insect hydrocarbons. In Blomquist, G.J. & Bagnères, A.-G (Eds.). **Insect hydrocarbons biology, biochemistry, and chemical ecology**. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 492 pp.
- Brenner, R. J., D. A. Carlson, L. M. Roth & R. S. Patterson. 1993. Morphological and chemotaxonomic identification of *Blattella* cockroaches (Blattaria: Blattellidae) from Taiwan and selected Pacific basin locations. **Invertebrate Taxonomy**. **7**: 1205-1219.
- Brown, W. V., R. Morton, M. J. Lacey, J. P. Spradbery & R. J. Mahon. 1998. Identification of the geographical source of adults of the old world screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae), by multivariate analysis of cuticular hydrocarbons. **Comparative Biochemistry and Physiology B**. **119**: 391-399.
- Byrne, A. L., M. A. Camann, T. L. Cyr, E. P. Catts & K. E. Espelie. 1995. Forensic implications of biochemical differences among geographic populations of the black blowfly, *Phormia regina* (Meigen). **Journal of Forensic Sciences**. **40**: 372-377
- Catts, E. P. & M. L. Goff. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Review of Entomology** **37**: 253-272.
- Cornaby, B. W. 1974. Carrion reduction by animals in contrasting tropical habitats. **Biotropica** **6**: 51-63.
- Drijfhout, F. P. 2010. Cuticular hydrocarbons: a new tool in forensic entomology? *In*: J. Amendt & M. L. Goff (Eds.) **Current concepts in forensic entomology**. Dordrecht (Holanda), Heidelberg (Alemanha), London (Inglaterra) e Nova York (Estados Unidos). Springer. 376 pp.
- El-Sayed, A. M. 2008. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. <<http://www.pherobase.com>>.

- Goff, M. L. 1991. Comparison of insect species associated with decomposing remains recovered inside dwellings and outdoors on the island of Oahu, Hawaii. **Journal of Forensic Sciences** **36**: 748-753.
- Goodrich, B. S. 1970. Cuticular lipids of adults and puparia of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina* (Wied.). **Journal of Lipid Research** **11**: 1-6.
- Hanski, I. & P. Hammond. 1986. Assemblages of carrion and dung Staphylinidae in tropical rain forests in Sarawak, Borneo. **Annales de Entomologici Fennici** **52**: 1-19.
- Harvey, M. L.; M. W. Mansell, M. H. Villet & I.R. Dadour. 2003. Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. **Medical and Veterinary Entomology** **17**: 363-369.
- Hebanowska, E.; E. Malinski; A. Latowska; E. Dubis; K. Pihlaja, P. Oksman, J. Nawrot & J. Szafranek. A comparison of cuticular hydrocarbons of larvae and beetles of the *Tribolium destructor*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry** **96**(4): 815-819.
- Howard, R. W. & G. J. Blomquist. 2005. Ecological, behavioural, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. **Annual Review of Entomology** **50**: 371-393.
- Jacob, J. 1979. Chemotaxonomic investigations on the cuticular lipids of beetles. **Biochemical Systematics and Ecology** **7**: 141-145.
- Keh, B. 1985. Scope and applications of forensic entomology. **Annual Review of Entomology** **30**: 137-154.
- Kulshrestha, P. & D. K. Satpathy. 2001. Use of beetles in forensic entomology. **Forensic Science International** **120**: 15-17.
- Mise, K.M.; L.M. Massutti, & M. O. Moura. 2007. Levantamento da fauna de Coleoptera que habita a carcaça de *Sus scrofa* L., em Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Entomologia** **51**: 358-368.
- Otranto D. & J. Stevens. 2002. Molecular approaches to the study of myiasis causing larvae. **International Journal for Parasitology** **32**(11): 1345–1360.
- Page, M., L. J. Nelson, M. I. Haverty & G. J. Blomquist. 1990. Cuticular hydrocarbons as chemotaxonomic characters for bark beetles: *Dendroctonus ponderosae*, *D. jeffreyi*, *D. brvicois*, and *D. frontalis* (Coleoptera: Scolytidae). **Annals of the Entomological Society of America** **83**: 892-901.

- Page, M.; L. J. Nelson; B. T. Forschler & M. I. Haverty. 2002. Cuticular hydrocarbons suggest three lineages in *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) from North America. **Comparative Biochemistry and Physiology B** **131**: 305-324.
- Smith, A. A.; B. Hölldober & J. Liebig. 2009. Cuticular hydrocarbons reliably identify cheaters and allow enforcement of altruism in a social insect. **Current Biology** **19**: 78-81.
- Sperling, R. A. H.; G. S. Anderson & D. A. Hickey. 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. **Journal of Forensic Sciences** **39**: 418-427.
- Steiger, S.; K. Peschke & J. K. Müller. 2008. Correlated changes in breeding status and polyunsaturated cuticular hydrocarbons: the chemical basis of nestmate recognition in the burying beetle *Nicrophorus vespilloides*? **Behav. Ecol. Sociobiol.** **62**: 1053-1060.
- Tregenza, T.; S. Buckley, V; Pritchard & R. Butlin. 2000. Inter- and intrapopulation effects of sex and age on epicuticular composition of meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus* . **Journal of Chemical Ecology** **26**: 257-278.
- Zhu, G. H.; G. Y. Ye; C. Hu; X. H. Xu & K. Li. 2006. Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: potential for determining larval age. **Medical and Veterinary Entomology** **20**: 438-444.

Capítulo III

Análise do gene citocromo oxidase I na diferenciação de espécies de Coleoptera de interesse forense

Resumo

A identificação precisa é fundamental para a utilização correta da evidência entomológica. Contudo, quando exemplares mal-preservedos ou quando as formas imaturas são coletadas, a identificação por caracteres morfológicos é difícil. Dessa forma, métodos alternativos devem ser utilizados para, além disso, dar mais rapidez para o uso da evidência entomológica. Neste estudo buscou-se testar se espécies de besouros comumente encontradas em carcaças no Brasil podem ser separadas com base na sequência do gene COI. Os protocolos utilizados provaram ser adequados para todas as espécies, apesar de problemas na extração e amplificação do DNA do gene COI das espécies de *Necrobia*. Todas as espécies puderam ser diferenciadas pelo método de Neighbor-Joining, sendo que a variação intraespecífica foi menor do que a interespecífica, com distâncias gênicas maiores do que 6,6% entre espécies. A futura publicação das sequências on-line (GenBank) possibilitará que, conforme forem sendo feitos estudos populacionais dessas espécies em outras regiões, essa diferenciação fique ainda mais precisa. Tendo em vista que as espécies utilizadas são comumente encontradas em carcaças, o presente estudo indica que o sequenciamento do gene COI facilitará a identificação no momento que estas espécies formarem parte da evidência entomológica, quando chaves com caracteres morfológicos não puderem ser utilizadas. Estudos adicionais devem ser feitos com *Necrobia rufipes* e *Necrobia ruficollis*, de modo a contornar algumas dificuldades metodológicas de extração e amplificação.

Abstract

The accurate identification is one of the main steps before using the entomological evidence. However when it is sampled poorly preserved specimens or immatures, the identification by morphological characters is difficult. Therefore alternative methods must be developed in order to reduce the amount of time prior to the use of entomological evidence. This study sought to test if beetle species commonly found on carcasses in Brazil may be differentiated by COI gene sequence. The protocols used proved to be adequate for all species, in spite of problems with the extraction and DNA amplification of COI gene of *Necrobia* spp. All species could be differentiated by Neighbor-Joining method, being the intra-specific variation less than the inter-specific, with genetic distances superior to 6.6% between species. The publication of on-line sequences (GenBank) will enable that, as more population studies of these species are done, that this difference gets clearer. As the species used are commonly found on carcasses, this study indicates that the COI gene sequencing will make it easier the identification when these species comprises part of the entomological evidence, when keys based on morphological characters may not be used. Further studies must be done with *Necrobia rufipes* and *Necrobia ruficollis*, in order to overcome some methodological difficulties of extraction and amplification.

1. Introdução

Há vários insetos que utilizam carcaças e fazem parte dos principais grupos de organismos decompositores. Entretanto, a relevância desse processo tem ultrapassado a sua participação na ciclagem de nutrientes (Cornaby 1974; Hanski 1986). Esse período de tempo em que os insetos vivem na carcaça do animal pode ser utilizado para determinar em quais circunstâncias a morte ocorreu e ainda estimar o intervalo pós-morte (IPM) (Keh 1985; Catts & Goff 1992) no contexto da Entomologia Forense. Tais estimativas podem ser baseadas na biologia ou na composição da comunidade de insetos encontrados em cadáveres. Contudo, antes de se utilizar a evidência entomológica em uma investigação legal, é fundamental a identificação adequada das espécies, pois pode haver variações nos períodos de colonização, duração do período de ovo e taxa de crescimento larval (Benecke & Wells 2001).

Harvey *et al.* (2003a) citam que a correta identificação pode ser difícil usando métodos baseados em morfologia. Isso se deve a vários fatores, os quais incluem: a diversidade das espécies, o estágio de vida em que o indivíduo foi coletado e a coleta apenas de insetos mortos. Outra dificuldade é que frequentemente são coletados os imaturos e sua diagnose é difícil, principalmente pela ausência de chaves de identificação de espécies. Para uma identificação precisa é necessária a criação dos imaturos até o estágio adulto, um processo que requer um tempo maior.

Otranto & Stevens (2002) salientam que nas condições longe das ideais das cenas de crimes, larvas e ovos de vários dípteros de importância forense são difíceis de distinguir, pois suas diferenças morfológicas podem estar mal preservadas.

Os mesmos problemas se mantêm em relação aos besouros. Coleoptera é a segunda ordem de maior interesse forense, com vários representantes necrófagos,

embora a maioria seja predadora. Quando corpos humanos em estágio avançado de decomposição são recuperados, os Coleoptera são a principal evidência entomológica na determinação do intervalo pós-morte (IPM) no campo da entomologia forense, baseada principalmente no padrão de sucessão (Kulshrestha & Satpathy 2001). Devido à competição com os Diptera, os Coleoptera necrófagos, ocorrem em estágios mais secos, porém os predadores chegam antes que as larvas de dípteros tenham abandonado os restos. Além disso, algumas espécies apresentam diferenças entre o hábito alimentar da fase adulta e das fases larvais. Goff (1991) citou que a ordem aumenta tanto em número de indivíduos quanto em número de espécies durante estágios avançados de decomposição de restos em ambiente aberto, no entanto estão ausentes ou parcamente representados em ambientes fechados.

Assim, técnicas mais apropriadas devem ser desenvolvidas para superar dificuldades associadas à identificação apenas por meio de caracteres morfológicos, principalmente para aumentar a acurácia. Estas técnicas também devem fornecer uma identificação rápida, que é crucial para uma bem-sucedida conclusão de um caso (Sperling *et al.* 1994).

Técnicas baseadas na análise de DNA parecem promissoras devido à durabilidade e estabilidade da molécula. A técnica pode também superar dificuldades associadas com a identificação morfológica, quando os espécimes estiverem danificados. Além disso, a análise molecular poderá fornecer uma identificação mais rápida, pois o DNA pode ser extraído de qualquer fase de desenvolvimento e o material analisado imediatamente. O sequenciamento do DNA possibilita estabelecer marcadores espécie-específicos, para o desenvolvimento de testes diagnósticos viáveis para uso na entomologia forense. O sequenciamento da região mitocondrial codificadora do gene citocromo oxidase I (COI) é particularmente útil nos estudos de evolução, genética de

populações e sistemática, devido ao seu relativo alto grau de polimorfismos (Malgorn & Coquoz 1999). De forma geral, o mtDNA têm uma taxa de mutação maior que o DNA nuclear (Moritz, 1987) e, portanto, uma maior chance de gerar marcadores espécie-específicos. Além disso, o mtDNA pode ser isolado mais facilmente que o DNA nuclear, o que representa uma clara vantagem para estudos forenses, onde espécimes podem ser incompletos ou mal preservados.

Sperling *et al.* (1994) foram os primeiros a demonstrar como dados sobre o sequenciamento do mtDNA de espécimes adultos de moscas de importância forense podem ser usados para identificar formas imaturas da mesma espécie. Utilizando as mesmas técnicas, Wells & Sperling (1999) concluíram que espécies de califorídeos, difíceis de separar taxonomicamente mesmo no estágio adulto, podem ser facilmente diferenciadas pelo mtDNA.

Os mesmos autores obtiveram dados sobre a sequência de COI e COII para mais de 20 espécies de moscas de carcaça encontradas na América do Norte. Em quase todos os casos, pode-se separar uma espécie, mesmo com a utilização de uma região com menos de 300 pares de bases.

Existem poucas publicações envolvendo o uso de técnicas de DNA por entomologistas forenses em Coleoptera. A maioria dos esforços tem sido para identificar as espécies de insetos com maior acurácia. É também possível identificar o conteúdo digestório de artrópodes hematófagos e necrófagos, e, conseqüentemente, associar um inseto a um humano (vivo ou morto) mesmo quando o contato entre os dois não foi observado (Benecke & Wells 2001). *Omosita* sp. (Nitidulidae) foi estudada por Dizinno *et al.* (2002) obtendo resultados positivos, que ilustram a tipificação do mtDNA humano proveniente de besouros necrófagos. Estas descobertas podem ter aplicação forense na identificação de restos em decomposição avançada e esqueletização.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral:

- Sequenciar parte do gene COI (DNAm) para diferenciação de espécies de Coleoptera de interesse forense.

2.2. Objetivos Específicos:

- Estabelecer protocolos para extração e amplificação do DNA para *Dermestes maculatus* (De Geer, 1774), *Necrobia rufipes* (DeGeer, 1775), *Necrobia ruficollis* (Fabricius, 1775), *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) e *Oxelytrum erythrurum* (Blanchard, 1840), para análise de marcadores espécie-específicos.
- Sequenciar parte da citocromo oxidase I (mtDNA) de *Dermestes maculatus*, *Necrobia rufipes*, *Necrobia ruficollis*, *Oxelytrum discicolle* e *Oxelytrum erythrurum*, para análise de marcadores espécie-específicos.

3. Material e Métodos

Para analisar a efetividade na separação de espécies pelas sequências do gene COI, foram selecionadas as espécies *Dermestes maculatus*, *Necrobia rufipes*, *Necrobia ruficollis*, *Oxelytrum cayennense*, *O. discicolle* e *O. erythrurum*.

A seleção destas espécies ocorreu com base em sua abundância em estudos de sucessão da fauna cadavérica, assim como pelo seu potencial forense. Para tanto, foram utilizados exemplares coletados em carcaça de *Sus scrofa* Linnaeus, 1758 em Curitiba -

PR. Contudo as espécies *N. rufipes*, *N. ruficollis* não foram coletadas em número suficiente. Para esses casos, foram utilizados exemplares provenientes de uma criação estoque, formada por exemplares de Curitiba com adição de espécimes de Campina Grande – PB (*N. rufipes*) ou Campinas-SP (*N. ruficollis*). Já os *Dermestes maculatus* e *Oxelytrum cayennense* utilizados, foram originários exclusivamente de Brasília-DF e Manaus – AM, respectivamente.

Foram estabelecidas duas metodologias de extração em virtude da dificuldade de se obter a quantidade necessária de DNA pela metodologia estabelecida à priori (utilizada para *Oxelytrum* spp.).

3.1. Extração do DNA de espécies de *Oxelytrum*

Para essas espécies, seguiu-se o protocolo de extração proposto por Cheung *et al.* (1993) modificado. Adultos das espécies *Oxelytrum discicolle*, *O. cayennense* e *O. erythrurum* tiveram seu material genético utilizado para o sequenciamento do gene COI (mtDNA). Cada adulto teve suas pernas retiradas e colocadas em um tubo de 1,5 mL contendo 200µL de tampão de extração (Tris HCl pH 8,0 200mM, NaCl 2,0M, EDTA pH 8,0 70 mM). O material foi triturado, colocado em 50µL de SDS 10%, homogeneizado, incubado a 65°C por 60 min e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 110µL de acetato de amônio 10M e 250µL de isopropanol gelado, e homogeneizado. As amostras foram congeladas a -20°C por 24 horas e após este período centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado duas vezes com etanol 70%.

O pellet de DNA foi seco à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em 100 µL de TE (Tris-HCl pH 8.0 10 mM e EDTA pH 8.0 1 mM) e armazenado a -20°C.

3.2. Extração de DNA dos adultos de *Dermestes maculatus*, *Necrobia rufipes* e *Necrobia ruficollis*

Para essas espécies foi utilizado o protocolo de extração de Cheung *et al.* (1993) modificada. Pernas e a musculatura torácica de exemplares das espécies foram retiradas e colocadas em álcool, sendo então congelado. O tecido foi colocado em microtubos de 1,5mL, aos quais foi adicionado 160µL de solução tampão de extração (Tris HCl pH 8,0 200mM, NaCl 2,0M, EDTA pH 8,0 70 mM), preparado na hora. O tecido foi macerado inicialmente com auxílio de um homogeneizador, sendo posteriormente utilizado um pistilo autoclavado. Logo após foi adicionado 20µL de SDS 10%, sendo o tubo homogeneizado e incubado por 3 horas a 60°C. Os tubos foram resfriados a temperatura ambiente, sendo adicionado 50µL de solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm e a fase aquosa do sobrenadante foi transferida para outro microtubo. Posteriormente foi adicionado 80µL de acetato de amônio 7,5M e 300 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram em seguida homogeneizados por inversão e congelados a -20°C por 30 minutos para precipitação do DNA. Após isso as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm e o precipitado lavado com etanol 70%. As amostras foram então novamente centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm, descartando depois o sobrenadante. O pellet contendo DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspensionado em 50µL de TE.

3.3. Amplificação e Sequenciamento

A reação de amplificação de parte do gene COI foi realizada utilizando os componentes: 50ng de DNA, 1 pmol/ μ L de iniciadores universais não purificados HCO2198 modificado (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA) e LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) produzidos pela Invitrogen, 1 U de Taq, tampão 1x, dNTP (0,2mM), MgCl (2mM) e quantidade necessária de água ultrapura para um volume final de 25 μ L. Foram feitas análises com o PCR Supermix® (Invitrogen), utilizando 22,5 μ L acrescido de 0,5 μ L de cada iniciador (50pmol) e 50ng de DNA. A reação de PCR foi feita em um termociclador Martercycler® (Eppendorf) e os parâmetros da reação foram: desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, sendo a temperatura de anelamento 45°C para *Oxelytrum* spp e 49°C para as demais espécies, por 1 minuto e elongação a 72°C por 2 minutos. Após o último ciclo, foi feita uma etapa de elongação final a 72°C por 4 minutos. Todas as reações foram acompanhadas de controles brancos para detectar a presença de possíveis contaminantes durante o processo de extração e preparação das reações de PCR.

A eficiência da amplificação foi verificada em gel de agarose 1%. Os amplificados foram enviados para a empresa Macrogen Inc. (<http://dna.macrogen.com>) para as reações de purificação e sequenciamento. A reação de sequenciamento ocorreu em um sequenciador automático, modelo ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems™). Visando corrigir possíveis erros ou ambiguidades de sequenciamento, foram sequenciadas ambas as fitas, “forward” e “reverse”, de cada amostra.

3.4. Alinhamento

As seqüências consenso foram obtidas utilizando o programa Staden Package (Rozen & Skaletsky, 1996; 1997; 1998), de modo a confirmar as seqüências. Todas as seqüências produzidas tiveram seus eletroferogramas analisados visualmente com auxílio do mesmo programa, a fim de ratificar as seqüências de nucleotídeos e aumentar a confiabilidade dos dados. As seqüências consenso foram alinhadas através do Clustal W 1.8 (Thompson *et al.* 1997), implementado através do BioEdit 7.0.9, usando os parâmetros padrão, sendo as seqüências editadas manualmente. Posteriormente, as seqüências foram submetidas ao Blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), de modo a confirmar o posicionamento taxonômico das mesmas. Para comparação, além das seqüências obtidas neste trabalho, foi utilizada a seqüência do gene COI de *Dermestes lardarius* (código de acesso - AY165734), que também pode ocorrer em carcaças (Gennard 2007).

3.5. Análise dos dados

Para testar se as espécies podem ser diferenciadas pelo gene COI, foi feita uma análise de Neighbor-Joining no programa Mega 5.0.5 (Tamura *et al.* 2011). O número de réplicas para o “Bootstrap” foi 5000, Kimura 2-parâmetros foi o modelo escolhido.

A divergência entre as seqüências foi calculada par a par com o modelo Kimura 2-parâmetros no programa Mega 5.0.5.

O “voucher” de cada indivíduo utilizado na análise será depositado na Coleção de Entomologia Padre Jesus Santiago Moure (DZUP) e as seqüências serão submetidas ao GenBank.

4. Resultados e Discussão

4.1. Extração de DNA

A extração do DNA foi bem-sucedida para todos os indivíduos, à exceção de alguns indivíduos do gênero *Necrobia*.

4.2. Amplificação

Do total de amostras utilizadas (64), apenas em 29 foi possível a amplificação da região do DNAm_t. O insucesso na amplificação do DNA de algumas amostras pode ser devido às espécies terem sido mantidas em álcool 90% por cerca de um ano. As espécies de *Necrobia* apresentaram repetidas vezes bandas duplas. Uma opção nesses casos pode ser cortar a banda do gel que corresponde ao fragmento desejado (± 650 pb) e após purificação, sequenciar este material.

4.3. Sequenciamento

Foram obtidas 23 seqüências, o fragmento amplificado tinha em torno de 658pb (Anexo I), mas para as análises foram utilizadas seqüências de 624 pb. Na seqüência

obtida a partir de *Necrobia rufipes* foram observadas *indels* nas posições 237 a 304 e 486.

O conteúdo A+T dos indivíduos utilizados na análise foi de 63,9% (Tab. VII), estando de acordo com os altos valores comumente encontrados para insetos no genoma mitocondrial (Simon *et al.* 1994).

4.4. Análise de agrupamentos

A análise de agrupamentos separou as espécies de maneira satisfatória com altos valores de bootstrap em cada agrupamento de espécies (Fig. 22), como já notado para outros grupos (Harvey *et al.* 2003b).

Estudos com espécies da família Silphidae se resumem ao trabalho de Benecke (1998) que usou a espécie *Oiceoptoma thoracicum* (L.), da mesma subfamília que *Oxelytrum* spp., para diferenciação de espécies necrófagas por RAPD. As seqüências de *Oxelytrum erythrurum* foram praticamente iguais entre si, com apenas um sítio polimórfico (Tab. VIII), e baixas distâncias genéticas (Tab. IX). O mesmo ocorreu para *O. cayennense*. Já em *O. discicolle* foi observada uma maior variação intraespecífica, com distâncias genéticas de até 3,1% (Tab. IX). Hebert *et al.* (2003) afirmaram que quase a totalidade das espécies tinha diferenças entre si de mais de 3%, sendo que no presente estudo para as espécies de *Oxelytrum* foi encontrada uma diferença maior que 6,6%. Dessa forma as distâncias genéticas intraespecíficas, mesmo estando altas para *O. discicolle*, por si só não justificam a separação em duas espécies, já que isso não é suportado por outros caracteres taxonômicos (Padial *et al.* 2010). Não há, portanto, problemas na separação dessa espécie em relação a *O. cayennense*, seu grupo irmão em

uma filogenia com caracteres morfológicos (Peck & Anderson 1985), já que as distâncias intraespecíficas estão muito abaixo das interespecíficas.

As demais espécies analisadas não foram contempladas ainda em nenhum estudo de diferenciação de espécies por caracteres moleculares. *Dermestes maculatus* apresentou pouca variação intraespecífica, sendo separado de *Dermestes lardarius* por distâncias genéticas entre 14,7 a 15,1%, com 87 sítios polimórficos entre as espécies. As espécies de *Necrobia* também apresentaram pouca variação intraespecífica, ao contrário do observado por Zehner (2004), sendo separadas entre si por distâncias entre 15,4 e 16,6% com 83 sítios polimórficos.

5. Considerações Finais

- Todas as espécies tiveram seus indivíduos agrupados pelo Neighbor-Joining, com variação intraespecíficas menores que as interespecíficas, com diferenças maiores do que 6,6% entre espécies.
- A publicação das seqüências on-line (GenBank) possibilitará que, conforme forem sendo feitos estudos populacionais dessas espécies em outras regiões, essa diferenciação fique ainda mais precisa.
- Tendo em vista que as espécies utilizadas são comumente encontradas em carcaças, o presente estudo indica que o sequenciamento da COI facilitará a identificação em estudos de entomologia forense quando chaves com caracteres morfológicos não puderem ser utilizadas.
- Para diferenciar *Necrobia rufipes* e *N. ruficollis*, de posse das seqüências fornecidas nesse trabalho, aconselha-se sintetizar um novo par de iniciadores que

anelem o fragmento em regiões mais específicas de modo a contornar as dificuldades encontradas com os métodos utilizados.

Tab. VII. Frequência média de bases (TCAG) e de A+T da citocromo oxidase subunidade I (COI) das principais espécies de Coleoptera de interesse forense.

Indivíduo	T(U)	C	A	G	A+T
<i>Oxelytrum discicolle</i> 1	28,4	17,5	34,0	20,1	62,4
<i>Oxelytrum discicolle</i> 2	28,4	17,5	34,0	20,1	62,4
<i>Oxelytrum discicolle</i> 3	27,6	17,8	32,9	21,7	60,5
<i>Oxelytrum discicolle</i> 4	28,6	17,3	34,0	20,1	62,6
<i>Oxelytrum discicolle</i> 5	28,4	17,5	34,0	20,1	62,4
<i>Oxelytrum erythrurum</i> 1	28,1	18,0	33,4	20,5	61,5
<i>Oxelytrum erythrurum</i> 2	28,1	18,0	33,4	20,5	61,5
<i>Oxelytrum erythrurum</i> 3	28,1	18,0	33,4	20,5	61,5
<i>Oxelytrum erythrurum</i> 4	28,1	18,0	33,4	20,5	61,5
<i>Oxelytrum erythrurum</i> 5	28,1	18,0	33,4	20,5	61,5
<i>Oxelytrum erythrurum</i> 6	28,1	18,0	33,4	20,5	61,5
<i>Oxelytrum cayennense</i> 1	28,4	17,3	34,7	19,6	63,1
<i>Oxelytrum cayennense</i> 2	28,4	17,3	34,5	19,7	62,9
<i>Dermestes maculatus</i> 1	31,8	16,4	35,2	16,7	66,9
<i>Dermestes maculatus</i> 2	31,8	16,4	35,2	16,7	66,9
<i>Dermestes maculatus</i> 3	31,6	16,5	35,3	16,5	66,9
<i>Dermestes maculatus</i> 4	31,8	16,4	35,5	16,4	67,3
<i>Dermestes maculatus</i> 5	31,8	16,4	35,3	16,5	67,1
<i>Dermestes lardarius</i>	32,1	16,2	33,1	18,6	65,2
<i>Necrobia ruficollis</i> 1	29,4	16,6	37,1	16,9	66,6
<i>Necrobia ruficollis</i> 2	29,1	16,9	37,1	17,0	66,1
<i>Necrobia ruficollis</i> 3	28,6	17,2	37,1	17,2	65,7
<i>Necrobia rufipes</i> 1	30,6	18,2	35,7	15,5	66,3
Média	29,4	17,3	34,6	18,8	63,9

Tab. VIII. Posição dos sítios polimórficos do gene citocromo oxidase subunidade I (COI), em cada espécie analisada. O “–” indica espécies com apenas uma sequência. As posições em negrito indicam sítios em que não foi possível estabelecer se há polimorfismo.

Espécie	Posição dos Sítios polimórficos
<i>cayennense</i>	595
<i>discicolle</i>	9, 24, 39, 57, 62, 72, 90, 113, 180, 222, 279, 282, 303, 360, 429, 431, 495, 559, 6
<i>erythrurum</i>	0
<i>Oxelytrum</i>	6, 9, 12, 24, 30, 39, 45, 47, 54, 57, 60, 62, 65, 72, 81, 87, 90, 93, 99, 101, 102, 108, 113, 114, 120, 126, 135, 143, 144, 150, 153, 171, 174, 180, 186, 195, 201, 204, 207, 222, 231, 236, 242, 243, 249, 264, 267, 279, 282, 303, 336, 339, 351, 360, 390, 396, 411, 420, 429, 431, 437, 441, 456, 468, 471, 474, 477, 480, 487, 495, 499, 511, 517, 526, 529, 538, 541, 550, 559, 580, 592, 595, 601, 604, 610, 613, 619
<i>maculatus</i>	62, 72, 168, 405
<i>lardarius</i>	-
<i>Dermestes</i>	12, 15, 24, 33, 45, 57, 60, 62, 63, 65, 69, 72, 84, 90, 95, 96, 105, 108, 111, 113, 114, 138, 143, 144, 153, 168, 186, 189, 192, 201, 219, 234, 236, 252, 257, 258, 261, 264, 279, 288, 291, 296, 297, 300, 303, 306, 315, 339, 351, 353, 357, 359, 365, 366, 369, 375, 393, 405, 408, 420, 423, 429, 431, 441, 444, 446, 462, 474, 477, 487, 490, 499, 520, 543, 544, 552, 553, 556, 565, 594, 610, 622, 624
<i>ruficollis</i>	15, 51, 69, 214, 228, 375 , 592
<i>rufipes</i>	-
<i>Necrobia</i>	2, 9, 12, 15, 21, 24, 27, 33, 36, 45, 47, 51, 57, 69, 75, 87, 96, 99, 101, 102, 104, 108, 112, 115, 117, 123, 126, 142, 144, 158, 171, 174, 189, 198, 210, 214, 225, 228, 234, 309, 321, 341, 354, 356, 357, 359, 365, 366, 369, 372, 375, 377, 378, 380, 381, 383, 414, 420, 424, 429, 435, 437, 438, 441, 453, 456, 462, 474, 486 , 502, 523, 538, 542, 553, 559, 565, 568, 574, 592, 601

Tab. IX. Matriz da distância genética entre a região da citocromo oxidase subunidade I de cada exemplar utilizado.

		Código																						
Código	Indivíduo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	<i>Oxelytrum discicolle</i> 1	0,000																						
2	<i>Oxelytrum discicolle</i> 2	0,000	0,000																					
3	<i>Oxelytrum discicolle</i> 3	0,030	0,030	0,000																				
4	<i>Oxelytrum discicolle</i> 4	0,002	0,002	0,031	0,000																			
5	<i>Oxelytrum discicolle</i> 5	0,000	0,000	0,030	0,002	0,000																		
6	<i>Oxelytrum erythrurum</i> 1	0,127	0,127	0,129	0,125	0,127	0,000																	
7	<i>Oxelytrum erythrurum</i> 2	0,127	0,127	0,129	0,125	0,127	0,000	0,000																
8	<i>Oxelytrum erythrurum</i> 3	0,127	0,127	0,129	0,125	0,127	0,000	0,000	0,000															
9	<i>Oxelytrum erythrurum</i> 4	0,127	0,127	0,129	0,125	0,127	0,000	0,000	0,000	0,000														
10	<i>Oxelytrum erythrurum</i> 5	0,127	0,127	0,129	0,125	0,127	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000													
11	<i>Oxelytrum erythrurum</i> 6	0,127	0,127	0,129	0,125	0,127	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000												
12	<i>Oxelytrum cayennense</i> 1	0,069	0,069	0,077	0,068	0,069	0,118	0,118	0,118	0,118	0,118	0,118	0,000											
13	<i>Oxelytrum cayennense</i> 2	0,068	0,068	0,075	0,066	0,068	0,116	0,116	0,116	0,116	0,116	0,116	0,002	0,000										
14	<i>Dermestes maculatus</i> 1	0,212	0,212	0,226	0,212	0,212	0,206	0,206	0,206	0,206	0,206	0,206	0,183	0,181	0,000									
15	<i>Dermestes maculatus</i> 2	0,212	0,212	0,226	0,212	0,212	0,206	0,206	0,206	0,206	0,206	0,206	0,183	0,181	0,000	0,000								
16	<i>Dermestes maculatus</i> 3	0,210	0,210	0,223	0,210	0,210	0,204	0,204	0,204	0,204	0,204	0,204	0,181	0,179	0,003	0,003	0,000							
17	<i>Dermestes maculatus</i> 4	0,208	0,208	0,230	0,208	0,208	0,206	0,206	0,206	0,206	0,206	0,206	0,183	0,181	0,003	0,003	0,006	0,000						
18	<i>Dermestes maculatus</i> 5	0,210	0,210	0,228	0,210	0,210	0,204	0,204	0,204	0,204	0,204	0,204	0,185	0,183	0,002	0,002	0,005	0,002	0,000					
19	<i>Dermestes lardarius</i>	0,248	0,248	0,246	0,245	0,248	0,233	0,233	0,233	0,233	0,233	0,233	0,239	0,237	0,147	0,147	0,151	0,151	0,149	0,000				
20	<i>Necrobia ruficollis</i> 1	0,196	0,196	0,207	0,194	0,196	0,213	0,213	0,213	0,213	0,213	0,213	0,187	0,187	0,165	0,165	0,163	0,161	0,163	0,202	0,000			
21	<i>Necrobia ruficollis</i> 2	0,200	0,200	0,211	0,198	0,200	0,217	0,217	0,217	0,217	0,217	0,217	0,191	0,191	0,169	0,169	0,167	0,165	0,167	0,208	0,003	0,000		
22	<i>Necrobia ruficollis</i> 3	0,206	0,206	0,217	0,204	0,206	0,224	0,224	0,224	0,224	0,224	0,224	0,200	0,200	0,177	0,177	0,175	0,173	0,175	0,215	0,010	0,006	0,000	
23	<i>Necrobia rufipes</i> 1	0,240	0,240	0,261	0,240	0,240	0,238	0,238	0,238	0,238	0,238	0,238	0,247	0,247	0,212	0,212	0,210	0,207	0,210	0,234	0,154	0,161	0,166	0,000

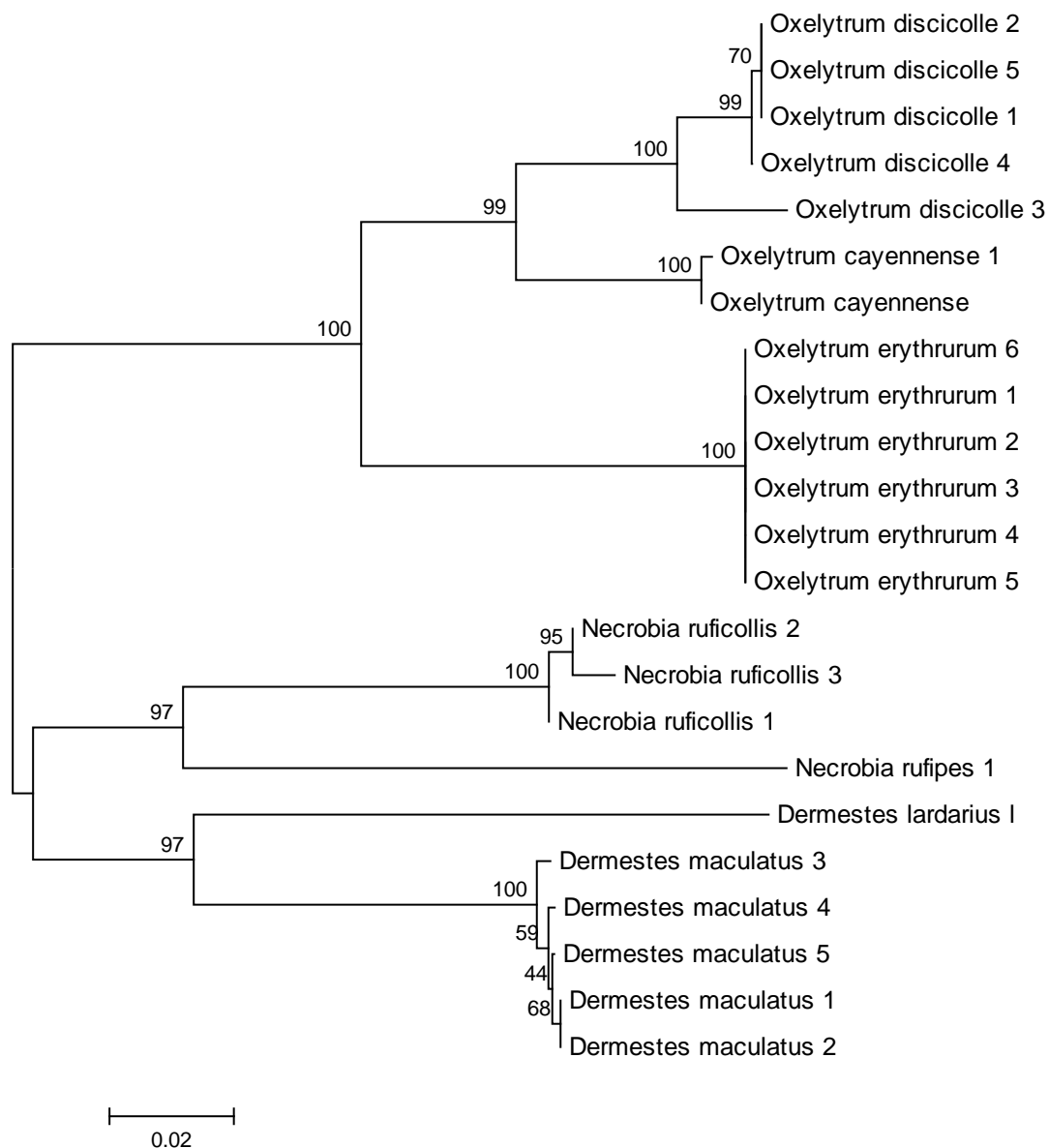


Fig. 22. Análise de agrupamento gerada pelo método de *Neighbor-joining*. A árvore ilustrada se refere a árvore com soma de comprimento dos ramos de 0.60404282. Número de réplicas para o *bootstrap* 5000, sendo as distâncias evolutivas computadas pelo método de Kimura 2-parâmetros.

6. Referências

- Benecke, M. 1998 Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophagous insects (Diptera, Coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice. **Forensic Science International** **98**: 157-168.
- Benecke, M & J. Wells. 2001. DNA techniques for forensic entomology. *In*: BYRD, J. H. & CASTNER, J. L. (Eds). **The utility of arthropods in legal investigations**. CRC Press Boca Raton London. New York, Washington, D.C.
- Catts, E. P. & M. L. Goff. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Review of Entomology** **27**:253-272.
- Cheung, W. Y.; N. Hubert & B. S. Landry. 1993. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **PCR methods and applications** **3**: 69-70.
- Cornaby, B. W. 1974. Carrion reduction by animals in contrasting tropical habitats. **Biotropica** **6**:51-63.
- Dizinno, J. A.; W. D. Lord; M. B. Collins-Morton; M. R. Wilson & M. L. Goff. Mitochondrial DNA sequencing of beetle larvae (Nitidulidae: *Omosita*) recovered from human bone. **Journal of Forensic Science** **47**(6): 1337-1339.
- Gennard, D.E. 2007. **Forensic Entomology: An introduction**. Chichester. John Wiley & Sons Ltd. 224 pp.
- Goff, M. L. 1991. Comparison of insect species associated with decomposing remains recovered inside dwellings and outdoors on the island of Oahu, Hawaii. **Journal of Forensic Sciences** **36**(3): 748-753.
- Hanski, I. 1986. Nutritional ecology of dung and carrion feeding insects. *In*: SLANSKY, F. & J. G. RODRIGUEZ (Ed.). 1986. **Nutritional ecology of insects, mites and spiders**. New York. John Wiley.
- Harvey, M.L., I. R. Dadour & S. Gaudieri. 2003a. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. **Forensic Science International** **131**: 134-139.
- Harvey, M. L.; M. W. Mansell, M. H. Villet & I.R. Dadour. 2003b. Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. **Medical and Veterinary Entomology** **17**: 363-369.

- Hebert, P. D. N.; A. Cywinska; S. L. Ball & J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences** **270**: S569-S599.
- Keh, B. 1985. Scope and applications of forensic entomology. **Annual of Review Entomology** **30**: 137-154.
- Kulshrestha, P. & D. K. Satpathy. 2001. Use of beetles in forensic entomology. **Forensic Science International** **120**: 15-17.
- Malgorn, Y. & R. Coquoz. 1999. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae: an interest in forensic entomology. **Forensic Science International** **102**: 111-119.
- Moritz, C.; T. E. Dowling; W. M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** **18**: 269-292.
- Otranto, D. & J. Stevens. 2002. Molecular approaches to the study of myiasis causing larvae. **International Journal for Parasitology** **32**(11): 1345–1360.
- Padial, J. M.; A. Miralles; I. Riva & M. Vences. 2010. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology** **7**: 16.
- Peck, S. B. & R. S. Anderson. 1985. Taxonomy, phylogeny and biogeography of the carrion beetles of Latin America (Coleoptera: Silphidae). **Quaestiones Entomologicae** **21**: 247-317.
- Simon, C.; F. Frati; A. Beckenbach; B. Crespi; H. Liu & P. Flooks. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America** **87**(6): 651-701.
- Sperling, R. A. H.; G. S. Anderson & D. A. Hickey. 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. **Journal of Forensic Sciences** **39**: 418-427.
- Steve Rozen, Helen J. Skaletsky (1996, 1997, 1998) Primer3. Code available at <http://www.genome.wi.mit.edu/genome software/other/primer3.htm>
- Tamura, K.; D. Peterson; N. Peterson; G. Stecher; M. Nei & S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).

- Thompson, J. D. D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1997. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** **22**: 4673-4680.
- Zehner R., Häberle M. and Amendt J. 2004. **Heteroplasmy in the *Necrobia* genome (Coleoptera: Cleridae): impact of DNA-based species determination.** Proceedings of the European Association for Forensic Entomology Conference, 29–30 March 2004, London; p 28.
- Wells, J. D. & F. A. H. Sperling. 1999. Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies*. **Journal of Medical Entomology** **36**: 222-226.

Anexos

Anexo I. Sequências da citocromo oxidase I (COI) obtidas a partir dos exemplares de Coleoptera analisados. Os números romanos se referem ao número do indivíduo dentro da espécie.

		10	20	30	40	50	60	70	
Oxelytrum	discicollae	1	AGAATTGGATCTCCTCCTCCTG	CAGGGTCAAAGAAGGATG	ATTAAGATTT	CGATCCGTTAATAGTATTG	TAATAGCT		
Oxelytrum	discicollae	2	AGAATTGGATCTCCTCCTCCTG	CAGGGTCAAAGAAGGATG	ATTAAGATTT	CGATCCGTTAATAGTATTG	TAATAGCT		
Oxelytrum	discicollae	3	AGAATTGGATCTCCTCCTCCTG	CAGGGTCAAAGAAGGATG	ATTAAGATTT	CGATCCGTTAATAGTATTG	TAATAGCT		
Oxelytrum	discicollae	4	AGAATTGGATCTCCTCCTCCTG	CAGGGTCAAAGAAGGATG	ATTAAGATTT	CGATCTGTTAATAGTATTG	TAATAGCT		
Oxelytrum	discicollae	5	AGAATTGGATCTCCTCCTCCTG	CAGGGTCAAAGAAGGATG	ATTAAGATTT	CGATCCGTTAATAGTATTG	TAATAGCT		
Oxelytrum	erythrurum	1	AGAATCGGGTCTCCTCCTCCTG	CTGGGTCAAGAAGGAAGTATTT	AAATTT	CGGTCTGTGAGTAATATTG	TAATAGCT		
Oxelytrum	erythrurum	2	AGAATCGGGTCTCCTCCTCCTG	CTGGGTCAAGAAGGAAGTATTT	AAATTT	CGGTCTGTGAGTAATATTG	TAATAGCT		
Oxelytrum	erythrurum	3	AGAATCGGGTCTCCTCCTCCTG	CTGGGTCAAGAAGGAAGTATTT	AAATTT	CGGTCTGTGAGTAATATTG	TAATAGCT		
Oxelytrum	erythrurum	4	AGAATCGGGTCTCCTCCTCCTG	CTGGGTCAAGAAGGAAGTATTT	AAATTT	CGGTCTGTGAGTAATATTG	TAATAGCT		
Oxelytrum	erythrurum	5	AGAATCGGGTCTCCTCCTCCTG	CTGGGTCAAGAAGGAAGTATTT	AAATTT	CGGTCTGTGAGTAATATTG	TAATAGCT		
Oxelytrum	erythrurum	6	AGAATCGGGTCTCCTCCTCCTG	CTGGGTCAAGAAGGAAGTATTT	AAATTT	CGGTCTGTGAGTAATATTG	TAATAGCT		
Oxelytrum	cayennense	1	AGAATAGGGTCACTCCTCCTG	CAGGGTCAAAGAAGGAAGTATTT	AAATTT	CGGTCTGTTAATAGTATTG	GATAGCT		
Oxelytrum	cayennense		AGAATAGGGTCACTCCTCCTG	CAGGGTCAAAGAAGGAAGTATTT	AAATTT	CGGTCTGTTAATAGTATTG	GATAGCT		
Dermestes	maculatus	1	AGAATAGGATCTCCACCTCCTG	CAGGATCAAAGAAAGAAGTATTT	AGATTT	CGATCAGTTAGTAATATTG	GATTGCT		
Dermestes	maculatus	2	AGAATAGGATCTCCACCTCCTG	CAGGATCAAAGAAAGAAGTATTT	AGATTT	CGATCAGTTAGTAATATTG	GATTGCT		
Dermestes	maculatus	3	AGAATAGGATCTCCACCTCCTG	CAGGATCAAAGAAAGAAGTATTT	AGATTT	CGATCAGTTAGTAATATTG	GATTGCT		
Dermestes	maculatus	4	AGAATAGGATCTCCACCTCCTG	CAGGATCAAAGAAAGAAGTATTT	AGATTT	CGATCAGTTAGTAATATTG	GATTGCT		
Dermestes	maculatus	5	AGAATAGGATCTCCACCTCCTG	CAGGATCAAAGAAAGAAGTATTT	AGATTT	CGATCAGTTAGTAATATTG	GATTGCT		
Dermestes	lardarius	1	AGAATAGGATCTCCTCCTCCTG	CTGGATCAAAAAAGAAGTATTT	AAAGATTT	CGATCTGTGAGAAGTATAGT	GATTGCT		
Necrobia	ruficollis	1	AAAAATGGGTCTCCTCCTCCTG	CAGGGTCAAAGAAAGAGGTATTT	AAAGATTT	CGATCTGTTAAAGTATTG	TAATTGCT		
Necrobia	ruficollis	2	AAAAATGGGTCTCCCCCTCCTG	CAGGGTCAAAGAAAGAGGTATTT	AAAGATTT	CGATCTGTTAAAGTATTG	TAATTGCT		
Necrobia	ruficollis	3	AAAAATGGGTCTCCCCCTCCTG	CAGGGTCAAAGAAAGAGGTATTT	AAAGATTT	CGATCTGTTAAAGTATTG	TAATTGCT		
Necrobia	rufipes	1	AGAATTGGATCCCTCCTCCAGCT	GGATCAAAAAATGATGATTT	AAATTT	CGATCAGTTAAAGTATTG	TAATAGCT		
		110	120	130	140	150	160	170	
Oxelytrum	discicollae	1	GGAGAAGAAGTAAGGCTGTAAT	TCCAACAGATCATACAAATAGGGGT	ATTCCGTCAAAAGTTATTCCAGTAGACCGTA				
Oxelytrum	discicollae	2	GGAGAAGAAGTAAGGCTGTAAT	TCCAACAGATCATACAAATAGGGGT	ATTCCGTCAAAAGTTATTCCAGTAGACCGTA				
Oxelytrum	discicollae	3	GGAGAAGAAGTAAGGCTGTAAT	TCCAACAGATCATACAAATAGGGGT	ATTCCGTCAAAAGTTATTCCAGTAGACCGTA				
Oxelytrum	discicollae	4	GGAGAAGAAGTAAGGCTGTAAT	TCCAACAGATCATACAAATAGGGGT	ATTCCGTCAAAAGTTATTCCAGTAGACCGTA				
Oxelytrum	discicollae	5	GGAGAAGAAGTAAGGCTGTAAT	TCCAACAGATCATACAAATAGGGGT	ATTCCGTCAAAAGTTATTCCAGTAGACCGTA				
Oxelytrum	erythrurum	1	ATAGAAGGAGCAGTGCTGTGATT	CTCAGATCAAAATAATGGTATACGATCAAAAGTTATTCCAGTGGATCGTA					
Oxelytrum	erythrurum	2	ATAGAAGGAGCAGTGCTGTGATT	CTCAGATCAAAATAATGGTATACGATCAAAAGTTATTCCAGTGGATCGTA					
Oxelytrum	erythrurum	3	ATAGAAGGAGCAGTGCTGTGATT	CTCAGATCAAAATAATGGTATACGATCAAAAGTTATTCCAGTGGATCGTA					
Oxelytrum	erythrurum	4	ATAGAAGGAGCAGTGCTGTGATT	CTCAGATCAAAATAATGGTATACGATCAAAAGTTATTCCAGTGGATCGTA					
Oxelytrum	erythrurum	5	ATAGAAGGAGCAGTGCTGTGATT	CTCAGATCAAAATAATGGTATACGATCAAAAGTTATTCCAGTGGATCGTA					
Oxelytrum	erythrurum	6	ATAGAAGGAGCAGTGCTGTGATT	CTCAGATCAAAATAATGGTATACGATCAAAAGTTATTCCAGTGGATCGTA					
Oxelytrum	cayennense	1	GAAGAAGGAGTATAGCTGTAAT	TCCAACAGATCATACAAATAGGGGT	ATTCCGTCAAAAGTTATTCCAGTAGACCGTA				
Oxelytrum	cayennense		GAAGAAGGAGTATAGCTGTAAT	TCCAACAGATCATACAAATAGGGGT	ATTCCGTCAAAAGTTATTCCAGTAGACCGTA				
Dermestes	maculatus	1	AAAGTAGTAGTAAAGCAGTAAT	TGCTACTGATCAAAATAAAGGTATTCCGATCAGGAGTTATTCCCTTTGATCGTA					
Dermestes	maculatus	2	AAAGTAGTAGTAAAGCAGTAAT	TGCTACTGATCAAAATAAAGGTATTCCGATCAGGAGTTATTCCCTTTGATCGTA					
Dermestes	maculatus	3	AAAGTAGTAGTAAAGCAGTAAT	TGCTACTGATCAAAATAAAGGTATTCCGATCAGGAGTTATTCCCTTTGATCGTA					
Dermestes	maculatus	4	AAAGTAGTAGTAAAGCAGTAAT	TGCTACTGATCAAAATAAAGGTATTCCGATCAGGAGTTATTCCCTTTGATCGTA					
Dermestes	maculatus	5	AAAGTAGTAGTAAAGCAGTAAT	TGCTACTGATCAAAATAAAGGTATTCCGATCAGGAGTTATTCCCTTTGATCGTA					
Dermestes	lardarius	1	AAAGAAAGAGAGTGAGTAAT	TACAGCTCAAAAGTAATGGTATTCCGTCAGGAGTTATTCCCTTTGATCGTA					
Necrobia	ruficollis	1	GCAATTAAGAGTAAATCGGTAA	TAAACACAGCTCAAAATAATGGTATTCCGATCTAGAGTTATTCCAGCAGGACGTA					
Necrobia	ruficollis	2	GCAATTAAGAGTAAATCGGTAA	TAAACACAGCTCAAAATAATGGTATTCCGATCTAGAGTTATTCCAGCAGGACGTA					
Necrobia	ruficollis	3	GCAATTAAGAGTAAATCGGTAA	TAAACACAGCTCAAAATAATGGTATTCCGATCTAGAGTTATTCCAGCAGGACGTA					
Necrobia	rufipes	1	AAAGTAATAAGAGCTGAATTA	TACAGCTCAAAATAAAGGTATTCCGATCTAAAGTTATTCCAGCTGGGCGTA					
		210	220	230	240	250	260	270	
Oxelytrum	discicollae	1	ATTTACAGCACCAGAAATTTGAT	GAGATTTCCAGCTAAATGTAGACTAAAGATAGCTAAATCTACAGATGAACCAACCATG					
Oxelytrum	discicollae	2	ATTTACAGCACCAGAAATTTGAT	GAGATTTCCAGCTAAATGTAGACTAAAGATAGCTAAATCTACAGATGAACCAACCATG					
Oxelytrum	discicollae	3	ATTTACAGCACCAGAAATTTGAT	GAGATTTCCAGCTAAATGTAGACTAAAGATAGCTAAATCTACAGATGAACCAACCATG					
Oxelytrum	discicollae	4	ATTTACAGCACCAGAAATTTGAT	GAGATTTCCAGCTAAATGTAGACTAAAGATAGCTAAATCTACAGATGAACCAACCATG					
Oxelytrum	discicollae	5	ATTTACAGCACCAGAAATTTGAT	GAGATTTCCAGCTAAATGTAGACTAAAGATAGCTAAATCTACAGATGAACCAACCATG					
Oxelytrum	erythrurum	1	ATTACGGCACCCGAGAATTTGA	GAGATTTCTGCTAAATGTAGTCTAAAAATAGCTAAATCTACTGATGAACCAACCATG					
Oxelytrum	erythrurum	2	ATTACGGCACCCGAGAATTTGA	GAGATTTCTGCTAAATGTAGTCTAAAAATAGCTAAATCTACTGATGAACCAACCATG					
Oxelytrum	erythrurum	3	ATTACGGCACCCGAGAATTTGA	GAGATTTCTGCTAAATGTAGTCTAAAAATAGCTAAATCTACTGATGAACCAACCATG					
Oxelytrum	erythrurum	4	ATTACGGCACCCGAGAATTTGA	GAGATTTCTGCTAAATGTAGTCTAAAAATAGCTAAATCTACTGATGAACCAACCATG					
Oxelytrum	erythrurum	5	ATTACGGCACCCGAGAATTTGA	GAGATTTCTGCTAAATGTAGTCTAAAAATAGCTAAATCTACTGATGAACCAACCATG					
Oxelytrum	erythrurum	6	ATTACGGCACCCGAGAATTTGA	GAGATTTCTGCTAAATGTAGTCTAAAAATAGCTAAATCTACTGATGAACCAACCATG					
Oxelytrum	cayennense	1	GTTTACAGCACCAGAAATTTGA	GAGATTTCCAGCTAGATGTAATCTAAAGATAGCTAAATCTACAGAAAGCAACCATG					
Oxelytrum	cayennense		GTTTACAGCACCAGAAATTTGA	GAGATTTCCAGCTAGATGTAATCTAAAGATAGCTAAATCTACAGAAAGCAACCATG					
Dermestes	maculatus	1	GTTTACTGCTCCAAGAAATTTGA	AGAAATTTCTGCAAGATGTAATCTAAAAATTTGCTAAATCAACAGAAAGCTCCTCCATG					
Dermestes	maculatus	2	GTTTACTGCTCCAAGAAATTTGA	AGAAATTTCTGCAAGATGTAATCTAAAAATTTGCTAAATCAACAGAAAGCTCCTCCATG					
Dermestes	maculatus	3	GTTTACTGCTCCAAGAAATTTGA	AGAAATTTCTGCAAGATGTAATCTAAAAATTTGCTAAATCAACAGAAAGCTCCTCCATG					
Dermestes	maculatus	4	GTTTACTGCTCCAAGAAATTTGA	AGAAATTTCTGCAAGATGTAATCTAAAAATTTGCTAAATCAACAGAAAGCTCCTCCATG					
Dermestes	maculatus	5	GTTTACTGCTCCAAGAAATTTGA	AGAAATTTCTGCAAGATGTAATCTAAAAATTTGCTAAATCAACAGAAAGCTCCTCCATG					
Dermestes	lardarius	1	ATTTACTGCTCCTAAAAATTTGA	AGAAATTTCTGCAAGATGAAGTCTAAAAATAGCTAAATCTACAGAAAGCTCCTCCATG					
Necrobia	ruficollis	1	ATTTACTGCTCCTAAAAATTTGA	AGAAATTTCTGCAAGATGAAGTCTAAAAATAGCTAAATCTACAGAAAGCTCCTCCATG					
Necrobia	ruficollis	2	ATTTACTGCTCCTAAAAATTTGA	AGAAATTTCTGCAAGATGAAGTCTAAAAATAGCTAAATCTACAGAAAGCTCCTCCATG					

Necrobria ruficollis 3 **ATTTACTGCTCCTGAAATTGAAGAAATACCTGCAAGATGAAGTCTAAAAATAGCTAAATCTACAGAAGATCCTCCATG**
Necrobria rufipes 1 **ATTTACTGCACCTAAAAATTGAAGAGATACCTGCCAA** -----

[illegible]

Dermestes lardarius 1 TAAATGCATGTGCTGTAACGATTACATTAAAAATTTGATCGTTTCCAATTAATGAGCCAGGTATTCCTAATTCTGTTCT
Necrobia ruficollis 1 TAAAAGCATGAGCAGTAACAATTACATTATAGATTTGGTCATTACCAATTAAGTTCCCTGGTGTCCCAATTCGGATC
Necrobia ruficollis 2 TAAAAGCATGAGCAGTAACAATTACATTATAGATTTGGTCATTACCAATTAAGTTCCCTGGTGTCCCAATTCGGATC
Necrobia ruficollis 3 TAAAAGCATGAGCAGTAACAATTACATTATAGATTTGGTCATTACCAATTAAGTTCCCTGGTGTCCCAATTCGGATC
Necrobia rufipes 1 TGAAAGCATGAGCAGTAACAATTACATTATAGATTTGATCAATCCCAATTAATGTTCCGGGTGTCCCTAATTCTGATC

610 620
 ----|----|----|----|----
Oxelytrum discicolle 1 ACCAACTATTCTGCTCAAGCACC
Oxelytrum discicolle 2 ACCAACTATTCTGCTCAAGCACC
Oxelytrum discicolle 3 CCCAACTATTCTGCTCAAGCACC
Oxelytrum discicolle 4 ACCAACTATTCTGCTCAAGCACC
Oxelytrum discicolle 5 ACCAACTATTCTGCTCAAGCACC
Oxelytrum erythrurum 1 ACCGACTATCCCAGCTCAGGCACC
Oxelytrum erythrurum 2 ACCGACTATCCCAGCTCAGGCACC
Oxelytrum erythrurum 3 ACCGACTATCCCAGCTCAGGCACC
Oxelytrum erythrurum 4 ACCGACTATCCCAGCTCAGGCACC
Oxelytrum erythrurum 5 ACCGACTATCCCAGCTCAGGCACC
Oxelytrum erythrurum 6 ACCGACTATCCCAGCTCAGGCACC
Oxelytrum cayennense 1 TCCAACTATTCTGCTCAAGCACC
Oxelytrum cayennense TCCAACTATTCTGCTCAAGCACC
Dermestes maculatus 1 TCCTACTATACCTGCTCATGCTCC
Dermestes maculatus 2 TCCTACTATACCTGCTCATGCTCC
Dermestes maculatus 3 TCCTACTATACCTGCTCATGCTCC
Dermestes maculatus 4 TCCTACTATACCTGCTCATGCTCC
Dermestes maculatus 5 TCCTACTATACCTGCTCATGCTCC
Dermestes lardarius 1 TCCTACTATTCTGCTCATGCACA
Necrobia ruficollis 1 TCCTACTATTCCAGCTCAAGCGCC
Necrobia ruficollis 2 TCCTACTATTCCAGCTCAAGCGCC
Necrobia ruficollis 3 TCCTACTATTCCAGCTCAAGCGCC
Necrobia rufipes 1 ACCTACTATTCCAGCTCAAGCGCC